

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:
Afdeling:

Titel dierproef: Bescherming van karper tegen infectie met *Trypanoplasma borreli* met behulp van het cytokine Tumor Necrosis Factor alpha

Aanmeldcode / Protocol: 2008057.a

Stadia van de proef:

28-05-2008	Aangemeld	
17-06-2008	Wijzigen	Secretaris van de DEC
20-06-2008	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Dit project is goedgekeurd in het kader van een AIO project ().

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. van dieren

Het directe doel van dit onderzoek is te bestuderen of een behandeling van karper met het cytokine

Tumor Necrosis Factor alpha (TNF),

een beschermend effect kan bieden tegen een in vivo parasitaire infectie met *Trypanoplasma borreli*.

Daartoe wordt, in vivo, een plasmide dat TNF tot expressie brengt geïnjecteerd en de vis tevens geïnfecteerd met de parasiet *T. borreli*.

De verwachting is dat TNF een signaal afgeeft dat leidt tot toename van het aantal witte bloedcellen, en daardoor leidt tot afname van het aantal parasieten.

Evaluatie van bescherming zal gebeuren door wekelijkse bloedafname om de parasitaemia te bepalen.

1.b. Het uiteindelijke doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

Het doel van de is meer inzicht te verkrijgen in het afweersysteem van vissen tbv immunostimulatie en vaccinatie-strategien in de aquacultuur.

alsmede meer inzicht te verkrijgen in de evolutionaire ontwikkeling van het afweersysteem van vertebraten.

Het uiteindelijke doel van deze onderzoekslijn is de immunrespons tegen deze parasiet te bestuderen.

Dit doel wordt bereikt door via PhDs en post-docs veelal MSc studenten te begeleiden bij hun leeronderzoek.

De parasiet infectie wordt bijgehouden door routinematige infectie van 'donor' vis waardoor er parasieten beschikbaar zijn voor in vitro experimenten of (in dit geval) in vivo experimenten.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 01-07-2008 tot 01-09-2008

3. Specificatie diergroepen:

TNFalpha-1 (a) 10	vissen *)	16 karpers en 16 zee	low-dose
TNF-alpha-1 (b) 10	vissen *)	Karpers high-dose	
TNF-alpha-2 (c) 10	vissen *)	Karpers low-dose	
TNF-alpha-2 (d) 10	vissen *)	Karpers high dose	
TNF-alpha 1 + 2 (e)	10 vissen *)	Karpers low dose	
TNF-alpha 1 + 2 (f)	10 vissen *)	Karpers high dose	
leeg plasmide (g)	10 vissen *)	Karpers high dose	

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

R3xR8 kruising, eigen kweek

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

Karper is de onderzoeks vissoort gebruikt door de [REDACTED].

Door met zijn allen te concentreren op een bepaalde vissoort wordt uitwisseling van onderzoeksgegevens vereenvoudigd.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

We hebben gekozen voor n=10 dieren per groep.

Door te kiezen voor tattooage van de dieren kunnen we alle proefgroepen in een enkel (groot) aquarium huisvesten.

Dit betekent dat we geen rekening hoeven houden met aquarium-effecten en dus niet de proefgroepen in meervoud hoeven toepassen.

Ondanks dat ieder dier een vaste hoeveelheid parasieten krijgt blijft de parasitaemia gewoonlijk vrij variabel.

De ervaring leert dat met een aantal van 10 dieren per groep deze variabiliteit ondervangen kan worden.

4.d. Herkomst:

TNFalpha-1 (a)	E. andere herkomst
TNF-alpha-1 (b)	E. andere herkomst
TNF-alpha-2 (c)	E. andere herkomst
TNF-alpha-2 (d)	E. andere herkomst
TNF-alpha 1 + 2 (e)	E. andere herkomst
TNF-alpha 1 + 2 (f)	E. andere herkomst
leeg plasmide (g)	E. andere herkomst

Toelichting:

R3xR8 karpers, eigen kweek [REDACTED]

5.a. Accommodatie:

5.b. Huisvesting & Verzorging:

geen speciale eisen

5.c. Voeding:

geen speciale eisen

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

We willen graag 2 genetische vormen (2 verschillende genproducten) testen: TNFa1 (groepen a en b) en TNFa2 (groepen c en d).

Het is niet duidelijk of deze genproducten dezelfde effecten hebben of zelfs een additief effect hebben, vandaar dat er ook een 1+ 2 groep is (groepen e en f).

Verder willen we graag twee doses testen.

We hebben gekozen voor injectie met een plasmide dat TNF tot expressie brengt.

In het vivo onderzoek met expressie via plasmides wordt veelal gekozen voor twee doses met een 10x verschil in concentratie.

Het is voor ons onmogelijk om op basis van in vitro studies de exact juiste in vivo dosis te kiezen.

Als controle wordt een lege plasmide die geen TNF tot expressie brengt gebruikt (groep g).

Hier verwachten we geen effect en is het dus niet nodig om ook nog een lage dosis groep in te brengen.

Behandeling:

-2 weken

Verdoving in TMS, tattooage

dag 0

Verdoving in TMS, injectie met plasmide (intra-musculair) en met parasiet

(intra-peritoneaal)

dag 14, 21, - 42 Verdoving in TMS, bloedafname (kleine hoeveelheid, 20-50 ul) ter bepaling parasitaemia (wekelijks)

6.b. Mate van ongerief:

TNFalpha-1 (a) D. Matig/Ernstig

TNF-alpha-1 (b) D. Matig/Ernstig

TNF-alpha-2 (c) D. Matig/Ernstig

TNF-alpha-2 (d) D. Matig/Ernstig

TNF-alpha 1 + 2 (e) D. Matig/Ernstig

TNF-alpha 1 + 2 (f) D. Matig/Ernstig

leeg plasmide (g) D. Matig/Ernstig

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Het ongerief bestaat uit verdoving en tattooage (gering ongerief), verdoving en injectie van plasmide (i.m.) en parasiet (i.p.), gering ongerief, wekelijkse bloedafname (start 2 weken na infectie) van kleine hoeveelheid bloed na verdoving (gering ongerief). Het ongerief tegen de parasiet is gekoppeld aan het verloop van de infectie en de parasitaemia. Door dit te controleren en die dieren met een te hoge parasitaemia uit de proef te nemen wordt dit ongerief beperkt tot matig. Echter, het totaal aan behandeling, bloedafname en immuunrespons leidt tot matig/ernstig ongerief voor iedere proefgroep.

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

TNFalpha-1 (a) D. Is wel toegepast.

TNF-alpha-1 (b) D. Is wel toegepast.

TNF-alpha-2 (c) D. Is wel toegepast.

TNF-alpha-2 (d) D. Is wel toegepast.

TNF-alpha 1 + 2 (e) D. Is wel toegepast.

TNF-alpha 1 + 2 (f) D. Is wel toegepast.

leeg plasmide (g) D. Is wel toegepast.

Pijnbestrijding:

TNFalpha-1 (a) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.

TNF-alpha-1 (b) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.

TNF-alpha-2 (c) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.

TNF-alpha-2 (d) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.

TNF-alpha 1 + 2 (e) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.

TNF-alpha 1 + 2 (f) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.

leeg plasmide (g) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.

Verdoving met TMS bij iedere behandeling.

Door de parasitaemia wekelijks te bepalen wordt bijgehouden hoe die zich individueel ontwikkelt.

Mocht onverhoopt de parasitaemia te veel toenemen ($> 1 \times 10^8/\text{ml}$) dan wordt de vis uit de proef

genomen.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

- TNFalpha-1 (a) Het dier is gedood na het einde van de proef.
- TNF-alpha-1 (b) Het dier is gedood na het einde van de proef.
- TNF-alpha-2 (c) Het dier is gedood na het einde van de proef.
- TNF-alpha-2 (d) Het dier is gedood na het einde van de proef.
- TNF-alpha 1 + 2 (e) Het dier is gedood na het einde van de proef.
- TNF-alpha 1 + 2 (f) Het dier is gedood na het einde van de proef.
- leeg plasmide (g) Het dier is gedood na het einde van de proef.

Toelichting:

In principe overleven de dieren de proef maar zullen worden gedood na beëindiging.

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Dit onderzoek is voor een deel eerst in vitro uitgevoerd mbv gen-expressie experimenten in karper witte bloedcellen gestimuleerd met de parasiet.

TNFalpha is de afgelopen 4 jaar al thema van onderzoek geweest.

Het huidige idee is dat TNFalpha, anders dan in de mens, niet een direct effect heeft op de parasiet maar vooral werkt via andere cellen.

Deze endotheliale cellen bevinden zich bijv. in de buikholte.

Na stimulatie door TNF verwachten we dat de endotheliale cellen oiv TNF een chemokine produceren die er voor zorgt dat de juiste witte bloedcellen in de juiste aantallen aangetrokken worden, ter bestrijding van de infectie, met als resultaat een lagere parasitaemia.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):



Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2008057.a (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					36	1	1	01					
TNFalpha-1 (a)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha-1 (b)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha-2 (c)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha-2 (d)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha 1 + 2 (e)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha 1 + 2 (f)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
leeg plasmide (g)	1	89	5	10					01	4	3	4	2

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:
Afdeling:

Titel dierproef: Bescherming van karper tegen infectie met Trypanoplasma borreli met behulp van het cytokine Tumor Necrosis Factor alpha

Aanmeldcode / Protocol: 2008057.b

Stadia van de proef:

20-06-2008	Aangemeld	
30-06-2008	Wijzigen	Secretaris van de DEC
28-11-2008	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Dit project is goedgekeurd in het kader van een AIO project ().

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. van dieren

Het directe doel van dit onderzoek is te bestuderen of een behandeling van karper met het cytokine

Tumor Necrosis Factor alpha (TNF),

een beschermend effect kan bieden tegen een in vivo parasitaire infectie met Trypanoplasma borreli.

Daartoe wordt, in vivo, een plasmide dat TNF tot expressie brengt geïnjecteerd en de vis tevens

geïnfecteerd met de parasiet T borreli.

De verwachting is dat TNF een signaal afgeeft dat leidt tot toename van het aantal witte bloedcellen, en

daardoor leidt tot afname van het aantal parasieten.

Evaluatie van bescherming zal gebeuren door wekelijkse bloedafname om de parasitaemia te bepalen.

Het uiteindelijk doel is de immuunrespons tegen deze parasieten te bestuderen.

Dit doel wordt bereikt door via PhDs en post-docs veelal MSc studenten te begeleiden op hun leeronderzoek.

De parasiet T. borreli behoort tot de familie van de Trypanosomatina en is nauw verwant aan de parasieten die slaapziekte veroorzaken bij de mens.

Onderzoek naar deze parasiet maakt deel uit van een langlopende onderzoeksvraag bij waarin gekeken wordt naar de functie van het afweersysteem van vissen en de rol van de verschillende moleculen in de afweer tegen ziekteverwekkers. De heeft gekozen voor dit parasietmodel vanwege de beheersbaarheid van het infectieverloop.

1.b. Het uiteindelijk doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

Het doel van de is meer inzicht te verkrijgen in het afweersysteem van vissen tbv immuunstimulatie en vaccinatie-strategien in de aquacultuur.

alsmede meer inzicht te verkrijgen in de evolutionaire ontwikkeling van het afweersysteem van vertebraten.

Het uiteindelijk doel van deze onderzoekslijn is de immuunrespons tegen deze parasiet te bestuderen. Dit doel wordt bereikt door via PhDs en post-docs veelal MSc studenten te begeleiden bij hun leeronderzoek.

De parasiet infectie wordt bijgehouden door routinematige infectie van 'donor' vis waardoor er parasieten beschikbaar zijn voor in vitro experimenten of (in dit geval) in vivo experimenten.

1.c. Leksamenvatting:

2. Gepland vanaf: 01-07-2008 tot 01-09-2008

3. Specificatie diergroepen:

TNFalpha-1 (a) 10	vissen *)	16 karpers en 16 zee	low-dose
TNF-alpha-1 (b) 10	vissen *)	Karpers high-dose	
TNF-alpha-2 (c) 10	vissen *)	Karpers low-dose	
TNF-alpha-2 (d) 10	vissen *)	Karpers high dose	
TNF-alpha 1 + 2 (e)	10 vissen *)	Karpers low dose	
TNF-alpha 1 + 2 (f)	10 vissen *)	Karpers high dose	
leeg plasmide (g)	10 vissen *)	Karpers	

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

R3xR8 kruising, eigen kweek

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

Karper is de onderzoeks vissoort gebruikt door de [REDACTED].

Door met zijn allen te concentreren op een bepaalde vissoort wordt uitwisseling van onderzoeksgegevens vereenvoudigd.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

We hebben gekozen voor n=10 dieren per groep.

Door te kiezen voor tattooage van de dieren kunnen we alle proefgroepen in een enkel (groot) aquarium huisvesten.

Dit betekent dat we geen rekening hoeven houden met aquarium-effecten en dus niet de proefgroepen in meervoud hoeven toepassen.

Ondanks dat ieder dier een vaste hoeveelheid parasieten krijgt blijft de parasitaemia gewoonlijk vrij variabel.

De ervaring leert dat met een aantal van 10 dieren per groep deze variabiliteit ondervangen kan worden.

4.d. Herkomst:

TNFalpha-1 (a)	E. andere herkomst
TNF-alpha-1 (b)	E. andere herkomst
TNF-alpha-2 (c)	E. andere herkomst
TNF-alpha-2 (d)	E. andere herkomst
TNF-alpha 1 + 2 (e)	E. andere herkomst
TNF-alpha 1 + 2 (f)	E. andere herkomst
leeg plasmide (g)	E. andere herkomst

Toelichting:

R3xR8 karpers, eigen kweek [REDACTED]

De R3xR8 kruising is een hybride kruising tussen twee zuivere karperlijnen die al lange tijd gekweekt worden bij de proefdier-accomodatatie.

De eigen kweek van deze dieren heeft twee groete voordelen:

- 1) er wordt gedurende jaren met vergelijkbaar genetisch materiaal gewerkt
- 2) de dieren zijn vrij van specifieke ziekten, in dit geval, met name de parasiet T borrelli

5.a. Accommodatie: [REDACTED]

5.b. Huisvesting & Verzorging:

volgens standaard protocol [REDACTED]

5.c. Voeding:

volgens standaard protocol [REDACTED]

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

We willen graag 2 genetische vormen (2 verschillende genproducten) testen: TNFa1 (groepen a en b) en TNFa2 (groepen c en d).

Het is niet duidelijk of deze genproducten dezelfde effecten hebben of zelfs een additief effect hebben, vandaar dat er ook een 1+ 2 groep is (groepen e en f).

Verder willen we graag twee doses testen.

We hebben gekozen voor injectie met een plasmide dat TNF tot expressie brengt.

In het vivo onderzoek met expressie via plasmides wordt veelal gekozen voor twee doses met een 10x verschil in concentratie.

Het is voor ons onmogelijk om op basis van in vitro studies de exact juiste in vivo dosis te kiezen.

Als controle wordt een lege plasmide die geen TNF tot expressie brengt gebruikt (groep g).

Hier verwachten we geen effect en is het dus niet nodig om ook nog een lage dosis groep in te brengen.

Behandeling:

-2 weken

Verdoving in TMS, tattooage

dag 0

Verdoving in TMS, injectie met plasmide (intra-musculair) en met parasiet

(intra-peritoneaal)

dag 14, 21, - 42 Verdoving in TMS, bloedafname (kleine hoeveelheid, 20-50 ul) ter bepaling parasitaemia (wekelijks)

In vitro, komt TNF inderdaad tot expressie wanneer karpercellen behandeld worden met de plasmides gebruikt in dit onderzoek.

Dit is bevestigd mbv PCR en antilichaam-detectie.

In vivo, is de verwachting dat de plasmide in spiercellen (intra-musculaire injectie) tot expressie komt.

Daar is veel onderzoek naar gedaan bij andere vissoorten.

De tot expressie aangezette spiercellen van de karper zullen vervolgens karper TNF tot expressie brengen.

Het karper TNF zal systemisch in omloop komen, de endotheliale cellen bereiken en daar waar de parasiet ook aanwezig is (buikholte) haar effect uitoefenen.

6.b. Mate van ongerief:

TNFalpha-1 (a) D. Matig/Ernstig

TNF-alpha-1 (b) D. Matig/Ernstig

TNF-alpha-2 (c) D. Matig/Ernstig

TNF-alpha-2 (d) D. Matig/Ernstig

TNF-alpha 1 + 2 (e) D. Matig/Ernstig

TNF-alpha 1 + 2 (f) D. Matig/Ernstig

leeg plasmide (g) D. Matig/Ernstig

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Het ongerief bestaat uit verdoving en tattooage (gering ongerief), verdoving en injectie van plasmide (i.m.) en parasiet (i.p.), gering ongerief, wekelijkse bloedafname (start 2 weken na infectie) van kleine

hoeveelheid bloed na verdoving (gering ongerief). Het ongerief tegen de parasiet is gekoppeld aan het verloop van de infectie en de parasitaemia. Door dit te controleren en die dieren met een te hoge parasitaemia uit de proef te nemen wordt dit ongerief beperkt tot matig. Echter, het totaal aan behandeling, bloedafname en immuunrespons leidt tot matig/ernstig ongerief voor iedere proefgroep.

Uiteindelijk worden de dieren gedood door overmaat TMS en verbloeding

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

- TNFalpha-1 (a) D. Is wel toegepast.
- TNF-alpha-1 (b) D. Is wel toegepast.
- TNF-alpha-2 (c) D. Is wel toegepast.
- TNF-alpha-2 (d) D. Is wel toegepast.
- TNF-alpha 1 + 2 (e) D. Is wel toegepast.
- TNF-alpha 1 + 2 (f) D. Is wel toegepast.
- leeg plasmide (g) D. Is wel toegepast.

Pijnbestrijding:

- TNFalpha-1 (a) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
- TNF-alpha-1 (b) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
- TNF-alpha-2 (c) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
- TNF-alpha-2 (d) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
- TNF-alpha 1 + 2 (e) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
- TNF-alpha 1 + 2 (f) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
- leeg plasmide (g) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.

Verdoving met TMS bij iedere behandeling.

Door de parasitaemia wekelijks te bepalen wordt bijgehouden hoe die zich individueel ontwikkelt. Mocht onverhoopt de parasitaemia te veel toenemen ($> 1 \times 10^8/\text{ml}$) dan wordt de vis uit de proef genomen.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

- TNFalpha-1 (a) Het dier is gedood na het einde van de proef.
- TNF-alpha-1 (b) Het dier is gedood na het einde van de proef.
- TNF-alpha-2 (c) Het dier is gedood na het einde van de proef.
- TNF-alpha-2 (d) Het dier is gedood na het einde van de proef.
- TNF-alpha 1 + 2 (e) Het dier is gedood na het einde van de proef.
- TNF-alpha 1 + 2 (f) Het dier is gedood na het einde van de proef.
- leeg plasmide (g) Het dier is gedood na het einde van de proef.

Toelichting:

In principe overleven de dieren de proef maar zullen worden gedood na beeindiging. Dit gebeurt dmv overdosis TMS en verbloeding.

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Dit onderzoek is voor een deel eerst in vitro uitgevoerd mbv gen-expressie experimenten in karper witte bloedcellen gestimuleerd met de parasiet.

TNFalpha is de afgelopen 4 jaar al thema van onderzoek geweest.

Het huidige idee is dat TNFalpha, anders dan in de mens, niet een direct effect heeft op de parasiet maar vooral werkt via andere cellen: endotheliale cellen.

Deze endotheliale cellen bevinden zich in de bloedvaten door het gehele lichaam, en ook in de bloedvaten in de buikholte.

Dit is van belang omdat de injectie van de parasiet in de buikholte gebeurt.

Na stimulatie door TNF verwachten we dat de endotheliale cellen oiv TNF een chemokine produceren die er voor zorgt dat de juiste witte bloedcellen in de juiste aantallen aangetrokken worden, ter bestrijding van de lokale infectie in de buikholte,

met als resultaat een lagere parasitaemia.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):



Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2008057.b (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					36	1	1	01					
TNFalpha-1 (a)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha-1 (b)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha-2 (c)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha-2 (d)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha 1 + 2 (e)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha 1 + 2 (f)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
leeg plasmide (g)	1	89	5	10					01	4	3	4	2

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:
Afdeling:

Titel dierproef: Bescherming van karper tegen infectie met *Trypanoplasma borreli* met behulp van het cytokine Tumor Necrosis Factor alpha

Aanmeldcode / Protocol: 2008057.c

Stadia van de proef:

28-11-2008	Aangemeld	
03-12-2008	Wijzigen	Secretaris van de DEC
03-12-2008	Wijzigen	Secretaris van de DEC
04-12-2008	Gekopieerd	
08-12-2008	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Dit project is goedgekeurd in het kader van een AIO project ().

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

Wetenschappelijke vraag m.b.t. van dieren

Het directe doel van dit onderzoek is te bestuderen of een behandeling van karper met het cytokine Tumor Necrosis Factor alpha (TNF), een beschermend effect kan bieden tegen een in vivo parasitaire infectie met *Trypanoplasma borreli*. Daartoe wordt, in vivo, een plasmide dat TNF tot expressie brengt geïnjecteerd en de vis tevens geïnfecteerd met de parasiet *T. borreli*.

De verwachting is dat TNF een signaal afgeeft dat leidt tot toename van het aantal witte bloedcellen, en daardoor leidt tot afname van het aantal parasieten.

Evaluatie van bescherming zal gebeuren door wekelijkse bloedafname om de parasitaemia te bepalen.

Het uiteindelijke doel is de immuunrespons tegen deze parasieten te bestuderen.

Dit doel wordt bereikt door via PhDs en post-docs veelal MSc studenten te begeleiden op hun leeronderzoek.

De parasiet *T. borreli* behoort tot de familie van de Trypanosomatina en is nauw verwant aan de parasieten die slaapziekte veroorzaken bij de mens.

Onderzoek naar deze parasiet maakt deel uit van een langlopende onderzoeksvraag bij waarin gekeken wordt naar de functie van het afweersysteem van vissen en de rol van de verschillende moleculen in de afweer tegen ziekteverwekkers. De heeft gekozen voor dit parasietmodel vanwege de beheersbaarheid van het infectieverloop.

1.b. Het uiteindelijke doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

Het doel van de is meer inzicht te verkrijgen in het afweersysteem van vissen tbv immuunstimulatie en vaccinatie-strategieën in de aquacultuur.

alsmede meer inzicht te verkrijgen in de evolutionaire ontwikkeling van het afweersysteem van vertebraten.

Het uiteindelijk doel van deze onderzoekslijn is de immuunrespons tegen deze parasiet te bestuderen. Dit doel wordt bereikt door via PhDs en post-docs veelal MSc studenten te begeleiden bij hun leeronderzoek.

De parasiet infectie wordt bijgehouden door routinematige infectie van 'donor' vis waardoor er parasieten beschikbaar zijn voor in vitro experimenten of (in dit geval) in vivo experimenten.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 05-01-2009 tot 26-02-2009

3. Specificatie diergroepen:

TNFalpha-1 (a) 10	vissen *)	16 karpers en 16 zee	low-dose
TNF-alpha-1 (b) 10	vissen *)	Karpers high-dose	
TNF-alpha-2 (c) 10	vissen *)	Karpers low-dose	
TNF-alpha-2 (d) 10	vissen *)	Karpers high dose	
TNF-alpha 1 + 2 (e)	10 vissen *)	Karpers low dose	
TNF-alpha 1 + 2 (f)	10 vissen *)	Karpers high dose	
leeg plasmide (g)	10 vissen *)	Karpers	

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

R3xR8 kruising, eigen kweek

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

Karper is de onderzoeks vissoort gebruikt door de [REDACTED].

Door met zijn allen te concentreren op een bepaalde vissoort wordt uitwisseling van onderzoeksgegevens vereenvoudigd.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

We hebben gekozen voor n=10 dieren per groep.

Door te kiezen voor tattooage van de dieren kunnen we alle proefgroepen in een enkel (groot) aquarium huisvesten.

Dit betekent dat we geen rekening hoeven houden met aquarium-effecten en dus niet de proefgroepen in meervoud hoeven toepassen.

Ondanks dat ieder dier een vaste hoeveelheid parasieten krijgt blijft de parasitaemia gewoonlijk vrij variabel.

De ervaring leert dat met een aantal van 10 dieren per groep deze variabiliteit ondervangen kan worden.

4.d. Herkomst:

TNFalpha-1 (a)	E. andere herkomst
TNF-alpha-1 (b)	E. andere herkomst
TNF-alpha-2 (c)	E. andere herkomst
TNF-alpha-2 (d)	E. andere herkomst
TNF-alpha 1 + 2 (e)	E. andere herkomst
TNF-alpha 1 + 2 (f)	E. andere herkomst
leeg plasmide (g)	E. andere herkomst

Toelichting:

R3xR8 karpers, eigen kweek [REDACTED]

De R3xR8 kruising is een hybride kruising tussen twee zuivere karperlijnen die al lange tijd gekweekt worden bij de proefdier-accomodatatie.

De eigen kweek van deze dieren heeft twee groete voordelen:

- 1) er wordt gedurende jaren met vergelijkbaar genetisch materiaal gewerkt
- 2) de dieren zijn vrij van specifieke ziekten, in dit geval, met name de parasiet *T. borreli*

5.a. Accommodatie: [REDACTED]

5.b. Huisvesting & Verzorging:

volgens standaard protocol [REDACTED]

5.c. Voeding:

volgens standaard protocol [REDACTED]

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

We willen graag 2 genetische vormen (2 verschillende genproducten) testen: TNFa1 (groepen a en b) en TNFa2 (groepen c en d).

Het is niet duidelijk of deze genproducten dezelfde effecten hebben of zelfs een additief effect hebben, vandaar dat er ook een 1+2 groep is (groepen e en f).

Verder willen we graag twee doses testen.

We hebben gekozen voor injectie met een plasmide dat TNF tot expressie brengt.

In het vivo onderzoek met expressie via plasmides wordt veelal gekozen voor twee doses met een 10x verschil in concentratie.

Het is voor ons onmogelijk om op basis van in vitro studies de exact juiste in vivo dosis te kiezen.

Als controle wordt een lege plasmide die geen TNF tot expressie brengt gebruikt (groep g).

Hier verwachten we geen effect en is het dus niet nodig om ook nog een lage dosis groep in te brengen.

Behandeling:

-2 weken Verdoving in TMS, tattooage

dag 0 Verdoving in TMS, injectie met plasmide (intra-musculair) en met parasiet (intra-peritoneaal)

dag 14, 21, - 42 Verdoving in TMS, bloedafname (kleine hoeveelheid, 20-50 µl) ter bepaling parasitaemia (wekelijks)

In vitro, komt TNF inderdaad tot expressie wanneer karperscellen behandeld worden met de plasmides gebruikt in dit onderzoek.

Dit is bevestigd mbv PCR en antilichaam-detectie.

In vivo, is de verwachting dat de plasmide in spiercellen (intra-musculaire injectie) tot expressie komt.

Daar is veel onderzoek naar gedaan bij andere vissoorten.

De tot expressie aangezette spiercellen van de karper zullen vervolgens karper TNF tot expressie brengen.

Het karper TNF zal systemisch in omloop komen, de endotheliale cellen bereiken en daar waar de parasiet ook aanwezig is (buikholte) haar effect uitoefenen.

EEN PILOT EXPERIMENT MET 2 VISSSEN HEEFT AANGETOOND DAT IN BEIDE VISSSEN INJECTIE VAN DE PLASMIDE IN DE SPIERCELLEN

INDERDAAD HET CYTOKINE TNF TOT EXPRESSIE BRENGT.

WE HEBBEN DIT KUNNEN AANTONEN DOOR MET EEN ANTI-TNF ANTILICHAAM KLEURING TE KRIJGEN IN CRYOSTAAT-COUPES

6.b. Mate van ongerief:

TNFalpha-1 (a) D. Matig/Ernstig

TNF-alpha-1 (b) D. Matig/Ernstig

TNF-alpha-2 (c) D. Matig/Ernstig

TNF-alpha-2 (d) D. Matig/Ernstig

TNF-alpha 1 + 2 (e)	D. Matig/Ernstig
TNF-alpha 1 + 2 (f)	D. Matig/Ernstig
leeg plasmide (g)	D. Matig/Ernstig

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Het ongerief bestaat uit verdoving en tattooage (gering ongerief), verdoving en injectie van plasmide (i.m.) en parasiet (i.p.), gering ongerief, wekelijkse bloedafname (start 2 weken na infectie) van kleine hoeveelheid bloed na verdoving (gering ongerief). Het ongerief tegen de parasiet is gekoppeld aan het verloop van de infectie en de parasitaemia. Door dit te controleren en die dieren met een te hoge parasitaemia uit de proef te nemen wordt dit ongerief beperkt tot matig. Echter, het totaal aan behandeling, bloedafname en immuunrespons leidt tot matig/ernstig ongerief voor iedere proefgroep.

Uiteindelijk worden de dieren gedood door overmaat TMS en verbloeding

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

TNFalpha-1 (a)	D. Is wel toegepast.
TNF-alpha-1 (b)	D. Is wel toegepast.
TNF-alpha-2 (c)	D. Is wel toegepast.
TNF-alpha-2 (d)	D. Is wel toegepast.
TNF-alpha 1 + 2 (e)	D. Is wel toegepast.
TNF-alpha 1 + 2 (f)	D. Is wel toegepast.
leeg plasmide (g)	D. Is wel toegepast.

Pijnbestrijding:

TNFalpha-1 (a)	C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
TNF-alpha-1 (b)	C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
TNF-alpha-2 (c)	C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
TNF-alpha-2 (d)	C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
TNF-alpha 1 + 2 (e)	C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
TNF-alpha 1 + 2 (f)	C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
leeg plasmide (g)	C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.

Verdoving met TMS bij iedere behandeling.

Door de parasitaemia wekelijks te bepalen wordt bijgehouden hoe die zich individueel ontwikkelt. Mocht onverhoopt de parasitaemia te veel toenemen ($> 1 \times 10^8/\text{ml}$) dan wordt de vis uit de proef genomen.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

TNFalpha-1 (a)	Het dier is gedood na het einde van de proef.
TNF-alpha-1 (b)	Het dier is gedood na het einde van de proef.
TNF-alpha-2 (c)	Het dier is gedood na het einde van de proef.
TNF-alpha-2 (d)	Het dier is gedood na het einde van de proef.
TNF-alpha 1 + 2 (e)	Het dier is gedood na het einde van de proef.
TNF-alpha 1 + 2 (f)	Het dier is gedood na het einde van de proef.
leeg plasmide (g)	Het dier is gedood na het einde van de proef.

Toelichting:

In principe overleven de dieren de proef maar zullen worden gedood na beeindiging.

Dit gebeurt dmv overdosis TMS en verbloeding.

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Dit onderzoek is voor een deel eerst in vitro uitgevoerd mbv gen-expressie experimenten in karper witte bloedcellen gestimuleerd met de parasiet.

TNFalpha is de afgelopen 4 jaar al thema van onderzoek geweest.

Het huidige idee is dat TNFalpha, anders dan in de mens, niet een direct effect heeft op de parasiet maar

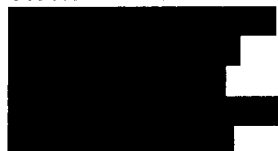
vooral werkt via andere cellen: endotheliale cellen.

Deze endotheliale cellen bevinden zich in de bloedvaten door het gehele lichaam, en ook in de bloedvaten in de buikholte.

Dit is van belang omdat de injectie van de parasiet in de buikholte gebeurt.

Na stimulatie door TNF verwachten we dat de endotheliale cellen oiv TNF een chemokine produceren die er voor zorgt dat de juiste witte bloedcellen in de juiste aantallen aangetrokken worden, ter bestrijding van de lokale infectie in de buikholte, met als resultaat een lagere parasitaemia.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):



Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2008057.c (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					36	1	1	01					
TNFalpha-1 (a)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha-1 (b)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha-2 (c)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha-2 (d)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha 1 + 2 (e)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha 1 + 2 (f)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
leeg plasmide (g)	1	89	5	10					01	4	3	4	2

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:
Afdeling:

Titel dierproef: Bescherming van karper tegen infectie met *Trypanoplasma borreli* met behulp van het cytokine Tumor Necrosis Factor alpha

Aanmeldcode / Protocol: 2008057.d

Stadia van de proef:

04-12-2008	Aangemeld
08-12-2008	Wijzigen
08-12-2008	Gekopieerd

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Dit project is goedgekeurd in het kader van een AIO project ().

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. van dieren

Het directe doel van dit onderzoek is te bestuderen of een behandeling van karper met het cytokine Tumor Necrosis Factor alpha (TNF),

een beschermend effect kan bieden tegen een in vivo parasitaire infectie met *Trypanoplasma borreli*.

Daartoe wordt, in vivo, een plasmide dat TNF tot expressie brengt geïnjecteerd en de vis tevens geïnfecteerd met de parasiet *T. borreli*.

De verwachting is dat TNF een signaal afgeeft dat leidt tot toename van het aantal witte bloedcellen, en daardoor leidt tot afname van het aantal parasieten.

Evaluatie van bescherming zal gebeuren door wekelijkse bloedafname om de parasitaemia te bepalen.

Het uiteindelijke doel is de immuunrespons tegen deze parasieten te bestuderen.

Dit doel wordt bereikt door via PhDs en post-docs veelal MSc studenten te begeleiden op hun leeronderzoek.

De parasiet *T. borreli* behoort tot de familie van de Trypanosomatina en is nauw verwant aan de parasieten die slaapziekte veroorzaken bij de mens.

Onderzoek naar deze parasiet maakt deel uit van een langlopende onderzoeksvraag bij waarin gekeken wordt naar de functie van het afweersysteem van vissen en de rol van de verschillende moleculen in de afweer tegen ziekteverwekkers. De heeft gekozen voor dit parasietmodel vanwege de beheersbaarheid van het infectieverloop.

1.b. Het uiteindelijke doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

Het doel van de is meer inzicht te verkrijgen in het afweersysteem van vissen tbv immuunstimulatie en vaccinatie-strategien in de aquacultuur.

alsmede meer inzicht te verkrijgen in de evolutionaire ontwikkeling van het afweersysteem van vertebraten.

Het uiteindelijk doel van deze onderzoekslijn is de immuunrespons tegen deze parasiet te bestuderen. Dit doel wordt bereikt door via PhDs en post-docs veelal MSc studenten te begeleiden bij hun leeronderzoek.

De parasiet infectie wordt bijgehouden door routinematige infectie van 'donor' vis waardoor er parasieten beschikbaar zijn voor in vitro experimenten of (in dit geval) in vivo experimenten.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 05-01-2009 tot 26-02-2009

3. Specificatie diergroepen:

TNFalpha-1 (a) 10	vissen *)	16 karpers en 16 zee	low-dose
TNF-alpha-1 (b) 10	vissen *)	Karpers high-dose	
TNF-alpha-2 (c) 10	vissen *)	Karpers low-dose	
TNF-alpha-2 (d) 10	vissen *)	Karpers high dose	
TNF-alpha 1 + 2 (e) 10	vissen *)	Karpers low dose	
TNF-alpha 1 + 2 (f) 10	vissen *)	Karpers high dose	
leeg plasmide (g) 10	vissen *)	Karpers	
Pilot exp: injectie plasmide 2	vissen *)		high dose

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

R3xR8 kruising, eigen kweek

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

Karper is de onderzoeks vissoort gebruikt door de [REDACTED].

Door met zijn allen te concentreren op een bepaalde vissoort wordt uitwisseling van onderzoeksgegevens vereenvoudigd.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

We hebben gekozen voor n=10 dieren per groep.

Door te kiezen voor tattooage van de dieren kunnen we alle proefgroepen in een enkel (groot) aquarium huisvesten.

Dit betekent dat we geen rekening hoeven houden met aquarium-effecten en dus niet de proefgroepen in meervoud hoeven toepassen.

Ondanks dat ieder dier een vaste hoeveelheid parasieten krijgt blijft de parasitaemia gewoonlijk vrij variabel.

De ervaring leert dat met een aantal van 10 dieren per groep deze variabiliteit ondervangen kan worden.

4.d. Herkomst:

TNFalpha-1 (a)	E. andere herkomst
TNF-alpha-1 (b)	E. andere herkomst
TNF-alpha-2 (c)	E. andere herkomst
TNF-alpha-2 (d)	E. andere herkomst
TNF-alpha 1 + 2 (e)	E. andere herkomst
TNF-alpha 1 + 2 (f)	E. andere herkomst
leeg plasmide (g)	E. andere herkomst
Pilot exp: injectie plasmide	E. andere herkomst

Toelichting:

R3xR8 karpers, eigen kweek [REDACTED]

De R3xR8 kruising is een hybride kruising tussen twee zuivere karperlijnen die al lange tijd gekweekt worden bij de proefdier-accommodatie.

De eigen kweek van deze dieren heeft twee groete voordelen:

- 1) er wordt gedurende jaren met vergelijkbaar genetisch materiaal gewerkt
- 2) de dieren zijn vrij van specifieke ziekten, in dit geval, met name de parasiet *T. borreli*

5.a. Accommodatie: [REDACTED]

5.b. Huisvesting & Verzorging:

De dieren worden gehuisvest in een recirculatiesysteem met water op 22 graden Celcius.
De dieren worden verzorgd door het personeel van [REDACTED].
Er worden geen speciale eisen gesteld aan de verzorging.

5.c. Voeding:

De dieren worden twee maal per dag gevoerd door het personeel van [REDACTED].
Er worden geen speciale eisen gesteld aan de voeding.
De dieren mogen ad lib gevoerd worden.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

We willen graag 2 genetische vormen (2 verschillende genproducten) testen: TNFa1 (groepen a en b) en TNFa2 (groepen c en d).

Het is niet duidelijk of deze genproducten dezelfde effecten hebben of zelfs een additief effect hebben, vandaar dat er ook een 1+2 groep is (groepen e en f).

Verder willen we graag twee doses testen.

We hebben gekozen voor injectie met een plasmide dat TNF tot expressie brengt.

In het vivo onderzoek met expressie via plasmides wordt veelal gekozen voor twee doses met een 10x verschil in concentratie.

Het is voor ons onmogelijk om op basis van in vitro studies de exact juiste in vivo dosis te kiezen.

Als controle wordt een lege plasmide die geen TNF tot expressie brengt gebruikt (groep g).

Hier verwachten we geen effect en is het dus niet nodig om ook nog een lage dosis groep in te brengen.

Behandeling:

-2 weken	Verdoving in TMS, tattooage
dag 0	Verdoving in TMS, injectie met plasmide (intra-musculair) en met parasiet (intra-peritoneaal)
dag 14, 21, - 42	Verdoving in TMS, bloedafname (kleine hoeveelheid, 20-50 µl) ter bepaling parasitaemia (wekelijks)

In vitro, komt TNF inderdaad tot expressie wanneer karperscellen behandeld worden met de plasmides gebruikt in dit onderzoek.

Dit is bevestigd mbv PCR en antilichaam-detectie.

In vivo, is de verwachting dat de plasmide in spiercellen (intra-musculaire injectie) tot expressie komt.

Daar is veel onderzoek naar gedaan bij andere vissoorten.

De tot expressie aangezette spiercellen van de karper zullen vervolgens karper TNF tot expressie brengen.

Het karper TNF zal systemisch in omloop komen, de endotheliale cellen bereiken en daar waar de parasiet ook aanwezig is (buikholte) haar effect uitoefenen.

EEN PILOT EXPERIMENT MET 2 VISSSEN HEEFT AANGETOOND DAT IN BEIDE VISSSEN INJECTIE VAN DE PLASMIDE IN DE SPIERCELLEN INDERDAAD HET CYTOKINE TNF TOT EXPRESSIE BRENGT. WE HEBBEN DIT KUNNEN AANTONEN DOOR MET EEN ANTI-TNF ANTILICHAAM KLEURING TE KRIJGEN IN CRYOSTAAT-COUPES

6.b. Mate van ongerief:

TNFalpha-1 (a) D. Matig/Ernstig
 TNF-alpha-1 (b) D. Matig/Ernstig
 TNF-alpha-2 (c) D. Matig/Ernstig
 TNF-alpha-2 (d) D. Matig/Ernstig
 TNF-alpha 1 + 2 (e) D. Matig/Ernstig
 TNF-alpha 1 + 2 (f) D. Matig/Ernstig
 leeg plasmide (g) D. Matig/Ernstig
 Pilot exp: injectie plasmide A. Gering

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Het ongerief bestaat uit verdoving en injectie van plasmide (i.m.). De dieren gedood door overmaat TMS en verbloeding, waarna spierweefsel verzameld wordt.

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

TNFalpha-1 (a) D. Is wel toegepast.
 TNF-alpha-1 (b) D. Is wel toegepast.
 TNF-alpha-2 (c) D. Is wel toegepast.
 TNF-alpha-2 (d) D. Is wel toegepast.
 TNF-alpha 1 + 2 (e) D. Is wel toegepast.
 TNF-alpha 1 + 2 (f) D. Is wel toegepast.
 leeg plasmide (g) D. Is wel toegepast.
 Pilot exp: injectie plasmide D. Is wel toegepast.

Pijnbestrijding:

TNFalpha-1 (a) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
 TNF-alpha-1 (b) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
 TNF-alpha-2 (c) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
 TNF-alpha-2 (d) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
 TNF-alpha 1 + 2 (e) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
 TNF-alpha 1 + 2 (f) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
 leeg plasmide (g) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
 Pilot exp: injectie plasmide C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.

Doden met overmaat TMS bij behandeling.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

TNFalpha-1 (a) Het dier is gedood na het einde van de proef.
 TNF-alpha-1 (b) Het dier is gedood na het einde van de proef.
 TNF-alpha-2 (c) Het dier is gedood na het einde van de proef.
 TNF-alpha-2 (d) Het dier is gedood na het einde van de proef.
 TNF-alpha 1 + 2 (e) Het dier is gedood na het einde van de proef.
 TNF-alpha 1 + 2 (f) Het dier is gedood na het einde van de proef.
 leeg plasmide (g) Het dier is gedood na het einde van de proef.
 Pilot exp: injectie plasmide Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.

Toelichting:

De twee dieren in de pilot worden gedood dmv overmaat TMS en verbloeding.

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Dit onderzoek is voor een deel eerst in vitro uitgevoerd mbv gen-expressie experimenten in karper witte bloedcellen gestimuleerd met de parasiet.

TNFalpha is de afgelopen 4 jaar al thema van onderzoek geweest.

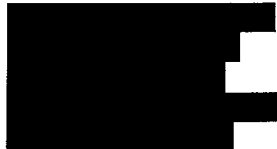
Het huidige idee is dat TNFalpha, anders dan in de mens, niet een direct effect heeft op de parasiet maar vooral werkt via andere cellen: endotheliale cellen.

Deze endotheliale cellen bevinden zich in de bloedvaten door het gehele lichaam, en ook in de bloedvaten in de buikholte.

Dit is van belang omdat de injectie van de parasiet in de buikholte gebeurt.

Na stimulatie door TNF verwachten we dat de endotheliale cellen oiv TNF een chemokine produceren die er voor zorgt dat de juiste witte bloedcellen in de juiste aantallen aangetrokken worden, ter bestrijding van de locale infectie in de buikholte, met als resultaat een lagere parasitaemia.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):



Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2008057.d (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					36	1	1	01					
TNFalpha-1 (a)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha-1 (b)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha-2 (c)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha-2 (d)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha 1 + 2 (e)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha 1 + 2 (f)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
leeg plasmide (g)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
Pilot exp: injectie plasmide	1	89	5	2					01	4	3	1	1

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:
Afdeling:

Titel dierproef: Bescherming van karper tegen infectie met *Trypanoplasma borreli* met behulp van het cytokine Tumor Necrosis Factor alpha

Aanmeldcode / Protocol: 2008057.e

Stadia van de proef:

08-12-2008	Aangemeld
08-12-2008	Goedgekeurd

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Dit project is goedgekeurd in het kader van een AIO project ().

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. van dieren

Het directe doel van dit onderzoek is te bestuderen of een behandeling van karper met het cytokine Tumor Necrosis Factor alpha (TNF),

een beschermend effect kan bieden tegen een in vivo parasitaire infectie met *Trypanoplasma borreli*.

Daartoe wordt, in vivo, een plasmide dat TNF tot expressie brengt geïnjecteerd en de vis tevens geïnfecteerd met de parasiet *T. borreli*.

De verwachting is dat TNF een signaal afgeeft dat leidt tot toename van het aantal witte bloedcellen, en daardoor leidt tot afname van het aantal parasieten.

Evaluatie van bescherming zal gebeuren door wekelijkse bloedafname om de parasitaemia te bepalen.

Het uiteindelijke doel is de immunrespons tegen deze parasieten te bestuderen.

Dit doel wordt bereikt door via PhDs en post-docs veelal MSc studenten te begeleiden op hun leeronderzoek.

De parasiet *T. borreli* behoort tot de familie van de Trypanosomatina en is nauw verwant aan de parasieten die slaapziekte veroorzaken bij de mens.

Onderzoek naar deze parasiet maakt deel uit van een langlopende onderzoeksvraag bij waarin gekeken wordt naar de functie van het afweersysteem van vissen en de rol van de verschillende moleculen in de afweer tegen ziekteverwekkers. De heeft gekozen voor dit parasietmodel vanwege de beheersbaarheid van het infectieverloop.

1.b. Het uiteindelijke doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

Het doel van de is meer inzicht te verkrijgen in het afweersysteem van vissen tbv immunstimulatie en vaccinatie-strategien in de aquacultuur.

alsmede meer inzicht te verkrijgen in de evolutionaire ontwikkeling van het afweersysteem van vertebraten.

Het uiteindelijk doel van deze onderzoekslijn is de immunrespons tegen deze parasiet te bestuderen. Dit doel wordt bereikt door via PhDs en post-docs veelal MSc studenten te begeleiden bij hun leeronderzoek.

De parasiet infectie wordt bijgehouden door routinematige infectie van 'donor' vis waardoor er parasieten beschikbaar zijn voor in vitro experimenten of (in dit geval) in vivo experimenten.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 05-01-2009 tot 26-02-2009

3. Specificatie diergroepen:

TNFalpha-1 (a) 10	vissen *)	16 karpers en 16 zee	low-dose
TNF-alpha-1 (b) 10	vissen *)	Karpers high-dose	
TNF-alpha-2 (c) 10	vissen *)	Karpers low-dose	
TNF-alpha-2 (d) 10	vissen *)	Karpers high dose	
TNF-alpha 1 + 2 (e) 10	vissen *)	Karpers low dose	
TNF-alpha 1 + 2 (f) 10	vissen *)	Karpers high dose	
leeg plasmide (g) 10	vissen *)	Karpers	
Pilot exp: injectie plasmide 2	vissen *)	Karpers high dose	

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

R3xR8 kruising, eigen kweek

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

Karper is de onderzoeks vissoort gebruikt door de [REDACTED].

Door met zijn allen te concentreren op een bepaalde vissoort wordt uitwisseling van onderzoeksgegevens vereenvoudigd.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

We hebben gekozen voor n=10 dieren per groep.

Door te kiezen voor tattooage van de dieren kunnen we alle proefgroepen in een enkel (groot) aquarium huisvesten.

Dit betekent dat we geen rekening hoeven houden met aquarium-effecten en dus niet de proefgroepen in meervoud hoeven toepassen.

Ondanks dat ieder dier een vaste hoeveelheid parasieten krijgt blijft de parasitaemia gewoonlijk vrij variabel.

De ervaring leert dat met een aantal van 10 dieren per groep deze variabiliteit ondervangen kan worden.

4.d. Herkomst:

TNFalpha-1 (a)	E. andere herkomst
TNF-alpha-1 (b)	E. andere herkomst
TNF-alpha-2 (c)	E. andere herkomst
TNF-alpha-2 (d)	E. andere herkomst
TNF-alpha 1 + 2 (e)	E. andere herkomst
TNF-alpha 1 + 2 (f)	E. andere herkomst
leeg plasmide (g)	E. andere herkomst
Pilot exp: injectie plasmide	E. andere herkomst

Toelichting:

R3xR8 karpers, eigen kweek [REDACTED]

De R3xR8 kruising is een hybride kruising tussen twee zuivere karperlijnen die al lange tijd gekweekt worden bij de proefdier-accomodatie.

De eigen kweek van deze dieren heeft twee groete voordelen:

- 1) er wordt gedurende jaren met vergelijkbaar genetisch materiaal gewerkt

2) de dieren zijn vrij van specifieke ziekten, in dit geval, met name de parasiet *T. borreli*

5.a. Accommodatie: [REDACTED]

5.b. Huisvesting & Verzorging:

De dieren worden gehuisvest in een recirculatiesysteem met water op 22 graden Celcius.

De dieren worden verzorgd door het personeel van [REDACTED].

Er worden geen speciale eisen gesteld aan de verzorging.

5.c. Voeding:

De dieren worden twee maal per dag gevoerd door het personeel van [REDACTED].

Er worden geen speciale eisen gesteld aan de voeding.

De dieren mogen ad lib gevoerd worden.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

We willen graag 2 genetische vormen (2 verschillende genproducten) testen: TNFa1 (groepen a en b) en TNFa2 (groepen c en d).

Het is niet duidelijk of deze genproducten dezelfde effecten hebben of zelfs een additief effect hebben, vandaar dat er ook een 1+ 2 groep is (groepen e en f).

Verder willen we graag twee doses testen.

We hebben gekozen voor injectie met een plasmide dat TNF tot expressie brengt.

In het vivo onderzoek met expressie via plasmides wordt veelal gekozen voor twee doses met een 10x verschil in concentratie.

Het is voor ons onmogelijk om op basis van in vitro studies de exact juiste in vivo dosis te kiezen.

Als controle wordt een lege plasmide die geen TNF tot expressie brengt gebruikt (groep g).

Hier verwachten we geen effect en is het dus niet nodig om ook nog een lage dosis groep in te brengen.

Behandeling:

-2 weken Verdoving in TMS, tattooage

dag 0 Verdoving in TMS, injectie met plasmide (intra-musculair) en met parasiet (intra-peritoneaal)

dag 14, 21, - 42 Verdoving in TMS, bloedafname (kleine hoeveelheid, 20-50 ul) ter bepaling parasitaemia (wekelijks)

In vitro, komt TNF inderdaad tot expressie wanneer karperscellen behandeld worden met de plasmides gebruikt in dit onderzoek.

Dit is bevestigd mbv PCR en antilichaam-detectie.

In vivo, is de verwachting dat de plasmide in spiercellen (intra-musculaire injectie) tot expressie komt.

Daar is veel onderzoek naar gedaan bij andere vissoorten.

De tot expressie aangezette spiercellen van de karper zullen vervolgens karper TNF tot expressie brengen.

Het karper TNF zal systemisch in omloop komen, de endotheliale cellen bereiken en daar waar de parasiet ook aanwezig is (buikholte) haar effect uitoefenen.

EEN PILOT EXPERIMENT MET 2 VISSSEN HEEFT AANGETOOND DAT IN BEIDE VISSSEN INJECTIE VAN DE PLASMIDE IN DE SPIERCELLEN

INDERDAAD HET CYTOKINE TNF TOT EXPRESSIE BRENGT.

WE HEBBEN DIT KUNNEN AANTONEN DOOR MET EEN ANTI-TNF ANTILICHAAM KLEURING TE KRIJGEN IN CRYOSTAAT-COUPES

6.b. Mate van ongerief:

TNFalpha-1 (a) D. Matig/Ernstig

TNF-alpha-1 (b) D. Matig/Ernstig
 TNF-alpha-2 (c) D. Matig/Ernstig
 TNF-alpha-2 (d) D. Matig/Ernstig
 TNF-alpha 1 + 2 (e) D. Matig/Ernstig
 TNF-alpha 1 + 2 (f) D. Matig/Ernstig
 leeg plasmide (g) D. Matig/Ernstig
 Pilot exp: injectie plasmide A. Gering

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Het ongerief bestaat uit verdoving en tattooage (gering ongerief), verdoving en injectie van plasmide (i.m.) en parasiet (i.p.), gering ongerief, wekelijkse bloedafname (start 2 weken na infectie) van kleine hoeveelheid bloed na verdoving (gering ongerief). Het ongerief tegen de parasiet is gekoppeld aan het verloop van de infectie en de parasitaemia. Door dit te controleren en die dieren met een te hoge parasitaemia uit de proef te nemen wordt dit ongerief beperkt tot matig. Echter, het totaal aan behandeling, bloedafname en immuunrespons leidt tot matig/ernstig ongerief voor iedere proefgroep.

Uiteindelijk worden de dieren gedood door overmaat TMS en verbloeding

Het ongerief bij de pilotproef bestaat uit verdoving en injectie van plasmide (i.m.). De dieren gedood door overmaat TMS en verbloeding, waarna spierweefsel verzameld wordt.

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

TNF-alpha-1 (a) D. Is wel toegepast.
 TNF-alpha-1 (b) D. Is wel toegepast.
 TNF-alpha-2 (c) D. Is wel toegepast.
 TNF-alpha-2 (d) D. Is wel toegepast.
 TNF-alpha 1 + 2 (e) D. Is wel toegepast.
 TNF-alpha 1 + 2 (f) D. Is wel toegepast.
 leeg plasmide (g) D. Is wel toegepast.
 Pilot exp: injectie plasmide D. Is wel toegepast.

Pijnbestrijding:

TNF-alpha-1 (a) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
 TNF-alpha-1 (b) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
 TNF-alpha-2 (c) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
 TNF-alpha-2 (d) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
 TNF-alpha 1 + 2 (e) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
 TNF-alpha 1 + 2 (f) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
 leeg plasmide (g) C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.
 Pilot exp: injectie plasmide C. Wordt niet toegepast omdat het praktisch niet uitvoerbaar is.

Doden met overmaat TMS bij behandeling.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

TNF-alpha-1 (a) Het dier is gedood na het einde van de proef.
 TNF-alpha-1 (b) Het dier is gedood na het einde van de proef.
 TNF-alpha-2 (c) Het dier is gedood na het einde van de proef.
 TNF-alpha-2 (d) Het dier is gedood na het einde van de proef.
 TNF-alpha 1 + 2 (e) Het dier is gedood na het einde van de proef.
 TNF-alpha 1 + 2 (f) Het dier is gedood na het einde van de proef.
 leeg plasmide (g) Het dier is gedood na het einde van de proef.
 Pilot exp: injectie plasmide Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

Toelichting:

De twee dieren in de pilot worden gedood dmv overmaat TMS en verbloeding.

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Dit onderzoek is voor een deel eerst in vitro uitgevoerd mbv gen-expressie experimenten in karper witte bloedcellen gestimuleerd met de parasiet.

TNFalpha is de afgelopen 4 jaar al thema van onderzoek geweest.

Het huidige idee is dat TNFalpha, anders dan in de mens, niet een direct effect heeft op de parasiet maar vooral werkt via andere cellen: endotheliale cellen.

Deze endotheliale cellen bevinden zich in de bloedvaten door het gehele lichaam, en ook in de bloedvaten in de buikholte.

Dit is van belang omdat de injectie van de parasiet in de buikholte gebeurt.

Na stimulatie door TNF verwachten we dat de endotheliale cellen oiv TNF een chemokine produceren die er voor zorgt dat de juiste witte bloedcellen in de juiste aantallen aangetrokken worden, ter bestrijding van de locale infectie in de buikholte, met als resultaat een lagere parasitaemia.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):



Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2008057.e (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					36	1	1	01					
TNFalpha-1 (a)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha-1 (b)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha-2 (c)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha-2 (d)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha 1 + 2 (e)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
TNF-alpha 1 + 2 (f)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
leeg plasmide (g)	1	89	5	10					01	4	3	4	2
Pilot exp: injectie plasmide	1	89	5	2					01	4	3	1	1

Uw aanvraag 2008057.a, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

De DEC onderschrijft het wetenschappelijke belang van de proef maar heeft bij de opzet een aantal (redactionele) vragen ter verheldering waarop ze een antwoord wil alvorens tot een definitieve afweging te komen:

De DEC verzoekt u te verduidelijken, waarom u kiest voor infectie met *Trypanosoma borelli*. Zij gaat ervan uit dat dit als model wordt gehanteerd.

Tevens verzoekt de DEC u aan te geven, op basis waarvan u verwacht, dat het gewenste resultaat wordt behaald (Hebt u ervaring met het toedienen van het plasmide? Gaat het geïnjecteerde plasmide uitsluitend in de doelcellen zitten? Komt TNF daadwerkelijk tot expressie?). Ingeval u hiermee geen ervaring heeft, verzoekt de DEC u eerst een pilot uit te voeren.

De DEC gaat ervan uit, dat bij 3 (specificatie diergroepen) de toevoeging "high dose" bij de groep "leeg plasmide" niet juist is en verzoekt u deze te verwijderen.

Tevens verzoekt de DEC u bij 4.b. (motivatie diersoort) te beargumenteren, waarom u kiest voor de R3 x R8-kruising.

Bij 5.b. en 5.c. (Huisvesting, verzorging en voeding) geeft u aan, dat er geen speciale eisen gelden. De DEC verzoekt u deze aspecten nader te specificeren of ingeval dat aanwezig is te verwijzen naar een standaardprotocol.

Tevens verzoekt de DEC u bij 6.a. toe te voegen dat de dieren worden gedood, bij 6.c. (bronnen van ongerief) het doden toe te voegen en bij 8 (toestand dieren na einde van de proef) aan te geven, hoe de dieren worden gedood. Ingeval ze worden gedood door TMS, geeft de DEC u in overweging de dieren bovendien te verbloeden, om er zeker van te zijn dat ze daadwerkelijk dood zijn.

Bij 9. geeft u aan dat de endotheliale cellen zich in de buikholte bevinden. Dit bevreemdt de DEC, aangezien zij ervan uitgaat, dat het cellen zijn, die het vaatstelsel van binnen bekleden en zij verzoekt u dit te verhelderen.

De antwoorden zullen door het klein comité worden besproken en afgehandeld.

Uw aanvraag 2008057.b, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

De DEC verzoekt u alsnog beknopt specificaties te vermelden m.b.t. huisvesting, verzorging en voeding, aangezien er (nog) geen 'standaardprotocol huisvesting [REDACTED]' beschikbaar is.

Tevens verzoekt de DEC u eerst een pilot uit te voeren met een gering aantal vissen, aangezien u zelf geen ervaring hebt met dit model, mede gezien het feit, dat het ongerief op matig/ernstig wordt geschat. Deze pilot zou antwoord moeten geven op de vraag of die plasmide op de juiste plek komt en of de spiercellen vervolgens overgaan tot het aanmaken van TNF.

Indien de status op 'wijzigen' is gezet en u wilt deze aanvraag gaan wijzigen, dan selecteert u deze aanvraag en kiest u vanuit het menu 'proef', en dan de optie 'wijzigen'. Er wordt dan een kopie van de originele aanvraag gemaakt. Deze kopie kunt u vervolgens wijzigen, en opnieuw aanmelden.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Secretaris DEC

Uw aanvraag 2008057.b, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

De DEC verzoekt u alsnog beknopt specificaties te vermelden m.b.t. huisvesting, verzorging en voeding, aangezien er (nog) geen 'standaardprotocol huisvesting [REDACTED]' beschikbaar is.

Tevens verzoekt de DEC u eerst een pilot uit te voeren met een gering aantal vissen, aangezien u zelf geen ervaring hebt met dit model, mede gezien het feit, dat het ongerief op matig/ernstig wordt geschat. Deze pilot zou antwoord moeten geven op de vraag of die plasmide op de juiste plek komt en of de spiercellen vervolgens overgaan tot het aanmaken van TNF.

Indien de status op 'wijzigen' is gezet en u wilt deze aanvraag gaan wijzigen, dan selecteert u deze aanvraag en kiest u vanuit het menu 'proef', en dan de optie 'wijzigen'. Er wordt dan een kopie van de originele aanvraag gemaakt. Deze kopie kunt u vervolgens wijzigen, en opnieuw aanmelden.

Met vriendelijke groet,

██████████

Secretaris DEC

Uw aanvraag 2008057.c, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

De DEC is van mening dat het doel van de proef opweegt tegen het te verwachten ongerief dat de dieren ondergaan. Voorafgaand aan een definitief advies verzoekt de DEC u alsnog beknopt de specificaties te vermelden m.b.t. huisvesting, verzorging en voeding, aangezien er (nog) geen 'standaardprotocol huisvesting' beschikbaar is. Daarnaast verzoekt de DEC u de twee vissen, die voor de pilot zijn gebruikt toe te voegen als extra groep.

Na aanpassing zal de proef worden afgehandeld door de secretaris van de DEC.

Indien de status op 'wijzigen' is gezet en u wilt deze aanvraag gaan wijzigen, dan selecteert u deze aanvraag en kiest u vanuit het menu 'proef', en dan de optie 'wijzigen'. Er wordt dan een kopie van de originele aanvraag gemaakt. Deze kopie kunt u vervolgens wijzigen, en opnieuw aanmelden.

Met vriendelijke groet,

██████████

Secretaris DEC

Uw aanvraag 2008057.d, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

Indien de status op 'wijzigen' is gezet en u wilt deze aanvraag gaan wijzigen, dan selecteert u deze aanvraag en kiest u vanuit het menu 'proef', en dan de optie 'wijzigen'. Er wordt dan een kopie van de originele aanvraag gemaakt. Deze kopie kunt u vervolgens wijzigen, en opnieuw aanmelden.

Met vriendelijke groet,

██████████

Proefdierdeskundige

Uw aanvraag 2008057.e, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Goedgekeurd' gekregen.

Met vriendelijke groet,

██████████

proefdierdeskundige