

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:
Afdeling:

Titel dierproef: Opwekken van polyklonale antilichamen in de kip tegen Immune-related Lectin-Like Receptoren (ILLRs) van de karper

Aanmeldcode / Protocol: 2011073.a

Stadia van de proef:

14-06-2011	Aangemeld	
23-06-2011	Wijzigen	Secretaris van de DEC
23-06-2011	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Dit onderzoek maakt deel uit van het door () goedgekeurde PhD project op naam van () met de titel: 'Comparative molecular characterization of Toll-like receptors activated by beta-glucans'.

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

F. Wetenschappelijke vraag m.b.t. ziekten van dieren

In de zebrafish (2006, Panagos et al. Immunogenetics. 58(1):31-40. 'Immune-related, lectin-like receptors are differentially expressed in the myeloid and lymphoid lineages of zebrafish.') zijn een aantal nieuwe receptoren geïdentificeerd in de groep II C-type lectine domein familie van de 'Natural Killer Cell Receptors' met inhiberende en activerende signaalmotieven. Het lijkt erop dat deze receptoren verschillend tot uitdrukking komen in verschillende sub-types van leukocyten hetgeen wijst op een immuun-regulerende functie en mogelijk een rol spelen bij de herkenning van pathogeen-geassocieerde moleculaire patronen (PAMPs).

In de karper hebben we onlangs twee receptoren van deze familie gevonden die tot expressie komen in immuunweefsel. Mogelijk spelen deze receptoren een rol bij de herkenning van PAMPs door het aangeboren afweersysteem. Mogelijke PAMPs die herkend zouden kunnen worden zijn beta-glucanen. Het is niet bekend waar ILLRs tot expressie komen; intra- of extra-cellulair op de celmembraan. Dit kan onderzocht worden mbv fluorescerende antilichamen. Het exacte werkingsmechanisme van de ILLRs is onbekend. Voor een beter begrip van dit werkingsmechanisme is het van belang te bepalen met welke andere eiwitten ILLR interacteert. Hiertoe worden co-immunoprecipitatie studies uitgevoerd. Er zijn geen commercieel verkrijgbare antilichamen tegen ILLR.

Direct doel: Verkrijgen van betere antilichamen tegen Immune-related Lectin-Like Receptors (ILLRs) van de karper

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

Doel:

Direct doel:

Verkrijgen van antilichamen tegen Immune-related Lectin-Like Receptors (ILLRs) van de karper

Uiteindelijk doel:

Met de verkregen antilichamen zal wetenschappelijk onderzoek naar het werkingsmechanisme van ILLR uitgevoerd worden.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 01-08-2011 tot 01-12-2011

3. Diersoort: kippen ; **Totaal aantal:** 2

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

Hennen van de hoge lijn (antistofproducerende lijn) van de Wageningen SRBC (sheep red blood cel) selectielijnen.

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

Eieren zijn een relatief diervriendelijke bron voor het verkrijgen van grote hoeveelheden antilichamen.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

De kippen zijn niet genetisch identiek en vertonen variatie in de antilichaamrespons tegen verschillende eiwitten. Van te voren is niet te voorspellen of een individuele kip voldoende goede antilichaamproductie tegen een bepaald eiwit geeft. In de praktijk blijkt het gebruik van twee kippen per antigeen (eiwit) echter goed te voldoende om in de meeste gevallen voldoende hoge antilichaamresponsen (in ten minste 1 van de kippen) op te wekken. Dit heeft als bijkomend voordeel dat de kippen per twee in een grondhok gehuisvest kunnen worden. Dit laatste komt enigszins tegemoet aan het sociale gedrag van kippen.

4.d. Herkomst: A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

De dieren behoren tot een middelzwaar legras dat geselecteerd is voor hoge antistofproductie.

5.a. Accommodatie: [REDACTED]

De twee kippen zullen bij elkaar in een grondhokken gehuisvest worden. Een probleem dat zich volgens de diervverzorgers kan gaan voordoen is dat er kippen in eieren gaan pikken. Om dit zoveel mogelijk te voorkomen zal gebruik gemaakt worden van legnesten met wegruibodem. In het (onwaarschijnlijke) geval dat kippen geen gebruik van dit legnest maken en de eieren frequent gaan aanpikken, zullen de betreffende kippen alsnog (per 2) in een legbatterijhok gehuisvest worden.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

Dieren ondergaan de normale verzorging (voeding, ad lib drinkwater) en grondhokhuisvesting voor legpluimvee.

5.c. Voeding:

Normaal opfokvoer voor legpluimvee.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De twee kippen zullen met een mengsel van twee ILLR receptoren geïmmuniseerd worden.

Immunisatieschema:

dag 0 - subcutane injectie met (per kip) maximaal 1.5 ml immuunmodulerende eiwitten in Specol (adjuvant) verdeeld over 2-3 plaatsen (max. 0.5 ml/injectieplaats).

dag 14 - subcutane injectie met (per kip) maximaal 1.5 ml immuunmodulerende eiwitten in Specol (adjuvant) verdeeld over 2-3 plaatsen (max. 0.5 ml/injectieplaats).

dag 42 - subcutane injectie met (per kip) maximaal 1.5 ml immuunmodulerende eiwitten in Specol (adjuvant) verdeeld over 2-3 plaatsen (max. 0.5 ml/injectieplaats).

dag 120 - beëindiging proef (euthanisering kippen).

Indien de antistof-titer te ver terug begint te lopen of nog niet afdoende is, zal nog een booster immunisatie (zoals beschreven bij dag 0) plaatsvinden voor beëindiging van de proef. Deze immunisatie zal dan tussen dag 50 en 70 plaatsvinden, afhankelijk van het verloop van de antilichaamtiter. De antilichaamtiter in de eidooiers zal daarvoor regelmatig bepaald worden. Indien er sterke verschillen in antilichaamtiter tussen eieren afkomstig uit hetzelfde hok, maar gelegd door verschillende kippen waargenomen worden, zal er op dag 28 en tussen dag 50 en 70 een bloedafname (0.5 -1.0 ml uit de vleugelvene) plaatsvinden. Deze extra bloedafname maakt het mogelijk een op de individuele kip afgestemde antigeenmix toe te dienen. De dieren zitten immers met ze tweeën in een hok.

6.b. Mate van ongerief: C. Matig

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

Herhaaldelijke immunisatie (s.c.) van eiwit in adjuvant (Specol). Deze wordt minimaal 3x uitgevoerd (zie proefopzet). Indien de antistoftiter nog onvoldoende hoog is of te veel begint in te zakken na de 3de immunisatie, zal er nog een 4de immunisatie gegeven worden. De immunisaties kunnen enige lokale irritatie geven.

Verder zal eventueel op dag 28 en tussen dag 50 en 70 0.5-1.0 ml bloed uit de vleugelvene afgenomen worden. Dit zal gebeuren indien de verschillen in antilichaamtiter tegen de verschillende eiwitten in de dooiers sterk verschillen tussen de individuele dieren. Met de bloedafname kan dan de ontwikkeling van de antistoftiter in individuele kippen te kunnen volgen en kunnen de vervolg immunisatie op de individuele dieren afgestemd worden.

Volgens de "Code of Practice voor het immuniseren van proefdieren" (augustus 2000, Werkgroep immunisatieprocedures, Keuringsdienst van Waren) dienen subcutane immunisaties met Specol als matig geclassificeerd te worden. Dit advies is hier overgenomen.

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

Anesthesie:

A. Niet toegepast (geen aanleiding).

Pijnbestrijding:

A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Er zal als adjuvant geen compleet freunds adjuvant toegepast worden, maar het mildere Specol. Afzondering van de kippen is in verband met verzameling van de eieren noodzakelijk. De kippen zullen met zijn tweeën in een grondhok gehouden worden om aan het sociale gedrag van kippen tegemoet te kunnen komen.

8. Toestand van dieren na einde van de proef: Het dier is gedood na het einde van de proef.

Toelichting:

Indien de dieren (voldoende) hoge antistof titers in hun eidooiers houden zullen de kippen uiterlijk 120 dagen na start van de immunisaties geeuthaniseerd worden.

De dieren zullen worden geeuthaniseerd d.m.v. decapitatie. Voor eventueel verder onderzoek zal na euthanasie de milt van de kippen verwijderd worden en worden de cellen hieruit geïsoleerd en ingevroren. Om beïnvloeding van de miltcellen te voorkomen is besloten om voor snelle decapitatie te kiezen en niet voor euthanasie dmv T61.

Voor het verkrijgen van specifieke polyklonale antilichamen is een intact immuunsysteem, en daarmee een proefdier, nodig.

De kippen worden niet solitair gehuisvest (wat op zich voordelen voor de identificatie van de eieren zou hebben), maar met twee in een kooi om zo enigszins te gemoed te komen aan het sociale karakter van de kip (een groepsdier).

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	51	1	2	36	1	1	01	01	1	1	3

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:
Afdeling:

Titel dierproef: Opwekken van polyklonale antilichamen in de kip tegen Immune-related Lectin-Like Receptoren (ILLRs) van de karper

Aanmeldcode / Protocol: 2011073.b

Stadia van de proef:

23-06-2011	Aangemeld		
23-06-2011	Positief advies na behandeling DEC	Secretaris van de DEC	
14-02-2012	Welzijnsevaluatie aangemaakt		
17-02-2012	Welzijnsevaluatie aangemeld		
17-02-2012	Welzijnsevaluatie goedgekeurd		

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Dit onderzoek maakt deel uit van het door () goedgekeurde PhD project op naam van met de titel: 'Comparative molecular characterization of Toll-like receptors activated by beta-glucans'.

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

F. Wetenschappelijke vraag m.b.t. ziekten van dieren

In de zebrafish (2006, Panagos et al. Immunogenetics. 58(1):31-40. 'Immune-related, lectin-like receptors are differentially expressed in the myeloid and lymphoid lineages of zebrafish.') zijn een aantal nieuwe receptoren geïdentificeerd in de groep II C-type lectine domein familie van de 'Natural Killer Cell Receptors' met inhiberende en activerende signaalmotieven. Het lijkt erop dat deze receptoren verschillend tot uitdrukking komen in verschillende sub-types van leukocyten hetgeen wijst op een immuun-regulerende functie en mogelijk een rol spelen bij de herkenning van pathogeen-geassocieerde moleculaire patronen (PAMPs).

In de karper hebben we onlangs twee receptoren van deze familie gevonden die tot expressie komen in immuunweefsel. Mogelijk spelen deze receptoren een rol bij de herkenning van PAMPs door het aangeboren afweersysteem. Mogelijke PAMPs die herkend zouden kunnen worden zijn beta-glucanen. Het is niet bekend waar ILLRs tot expressie komen; intra- of extra-celulair op de celmembraan. Dit kan onderzocht worden mbv fluorescerende antilichamen. Het exacte werkingsmechanisme van de ILLRs is onbekend. Voor een beter begrip van dit werkingsmechanisme is het van belang te bepalen met welke andere eiwitten ILLR interacteert. Hiertoe worden co-immunoprecipitatie studies uitgevoerd. Er zijn geen commercieel verkrijgbare antilichamen tegen ILLR.

Direct doel: Verkrijgen van betere antilichamen tegen Immune-related Lectin-Like Receptoren (ILLRs) van de karper

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

Doel:

Direct doel:

Verkrijgen van antilichamen tegen Immune-related Lectin-Like Receptors (ILLRs) van de karper

Uiteindelijk doel:

Met de verkregen antilichamen zal wetenschappelijk onderzoek naar het werkingsmechanisme van ILLR uitgevoerd worden.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 01-07-2011 tot 01-10-2011

3. Diersoort: kippen ; **Totaal aantal:** 2

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

Hennen van de hoge lijn (antistofproducerende lijn) van de Wageningen SRBC (sheep red blood cel) selectielijnen.

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

Eieren zijn een relatief diervriendelijke bron voor het verkrijgen van grote hoeveelheden antilichamen.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

De kippen zijn niet genetisch identiek en vertonen variatie in de antilichaamrespons tegen verschillende eiwitten. Van te voren is niet te voorspellen of een individuele kip voldoende goede antilichaamproductie tegen een bepaald eiwit geeft. In de praktijk blijkt het gebruik van twee kippen per antigeen (eiwit) echter goed te voldoende om in de meeste gevallen voldoende hoge antilichaamresponsen (in ten minste 1 van de kippen) op te wekken. Dit heeft als bijkomend voordeel dat de kippen per twee in een grondhok gehuisvest kunnen worden. Dit laatste komt enigszins tegemoet aan het sociale gedrag van kippen.

4.d. Herkomst: A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland**Toelichting:**

De dieren behoren tot een middelzwaar legras dat geselecteerd is voor hoge antistofproductie.

5.a. Accommodatie: [REDACTED]

De twee kippen zullen bij elkaar in een grondhok gehuisvest worden. Een probleem dat zich volgens de diervverzorgers kan gaan voordoen is dat er kippen in eieren gaan pikken. Om dit zoveel mogelijk te voorkomen zal gebruik gemaakt worden van legnesten met wegrolbodem. In het (onwaarschijnlijke) geval dat kippen geen gebruik van dit legnest maken en de eieren frequent gaan aanpikken, zullen de betreffende kippen alsnog (per 2) in een legbatterijhok gehuisvest worden.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

Dieren ondergaan de normale verzorging (voeding, ad lib drinkwater) en grondhokhuisvesting voor legpluimvee.

5.c. Voeding:

Normaal opfokvoer voor legpluimvee.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De twee kippen zullen met een mengsel van twee ILLR receptoren geïmmuniseerd worden.

Immunisatieschema:

dag 0 - subcutane injectie met (per kip) maximaal 1.5 ml immuunmodulerende eiwitten in Specol

(adjuvant) verdeeld over 2-3 plaatsen (max. 0.5 ml/injectieplaats).

dag 14 - subcutane injectie met (per kip) maximaal 1.5 ml immuunmodulerende eiwitten in Specol (adjuvant) verdeeld over 2-3 plaatsen (max. 0.5 ml/injectieplaats).

dag 42 - subcutane injectie met (per kip) maximaal 1.5 ml immuunmodulerende eiwitten in Specol (adjuvant) verdeeld over 2-3 plaatsen (max. 0.5 ml/injectieplaats).

dag 120 - beëindiging proef (euthanisering kippen).

Indien de antistof-titer te ver terug begint te lopen of nog niet afdoende is, zal nog een booster immunisatie (zoals beschreven bij dag 0) plaatsvinden voor beëindiging van de proef. Deze immunisatie zal dan tussen dag 50 en 70 plaatsvinden, afhankelijk van het verloop van de antilichaamtiter. De antilichaamtiter in de eidooiers zal daarvoor regelmatig bepaald worden. Indien er sterke verschillen in antilichaamtiter tussen eieren afkomstig uit hetzelfde hok, maar gelegd door verschillende kippen waargenomen worden, zal er op dag 28 en tussen dag 50 en 70 een bloedafname (0.5 -1.0 ml uit de vleugelvene) plaatsvinden. Deze extra bloedafname maakt het mogelijk een op de individuele kip afgestemde antigeenmix toe te dienen. De dieren zitten immers met ze tweeën in een hok.

6.b. Mate van ongerief: C. Matig

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

Herhaaldelijke immunisatie (s.c.) van eiwit in adjuvant (Specol). Deze wordt minimaal 3x uitgevoerd (zie proefopzet). Indien de antistoftiter nog onvoldoende hoog is of te veel begint in te zakken na de 3de immunisatie, zal er nog een 4de immunisatie gegeven worden. De immunisaties kunnen enige lokale irritatie geven.

Verder zal eventueel op dag 28 en tussen dag 50 en 70 0.5-1.0 ml bloed uit de vleugelvene afgenomen worden. Dit zal gebeuren indien de verschillen in antilichaamtiter tegen de verschillende eiwitten in de dooiers sterk verschillen tussen de individuele dieren. Met de bloedafname kan dan de ontwikkeling van de antistoftiter in individuele kippen te kunnen volgen en kunnen de vervolg immunisatie op de individuele dieren afgestemd worden.

De dieren worden ge-eutaniseerd.

Volgens de "Code of Practice voor het immuniseren van proefdieren" (augustus 2000, Werkgroep immunisatieprocedures, Keuringsdienst van Waren) dienen subcutane immunisaties met Specol als matig geclassificeerd te worden. Dit advies is hier overgenomen.

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

Anesthesie: A. Niet toegepast (geen aanleiding).

Pijnbestrijding: A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Er zal als adjuvant geen compleet Freund's adjuvant toegepast worden, maar het mildere Specol.

8. Toestand van dieren na einde van de proef: Het dier is gedood na het einde van de proef.

Toelichting:

Indien de dieren (voldoende) hoge antistof titers in hun eidooiers houden zullen de kippen uiterlijk 120 dagen na start van de immunisaties geëutaniseerd worden.

De dieren zullen worden geëutaniseerd d.m.v. decapitatie. Voor eventueel verder onderzoek zal na euthanasie de milt van de kippen verwijderd worden en worden de cellen hieruit geïsoleerd en ingevroren. Om beïnvloeding van de miltcellen te voorkomen is besloten om voor snelle decapitatie te kiezen en niet voor euthanasie dmv T61. Bovendien zal het bloed worden verzameld na afloop om te kijken of daar ook antilichamen in zitten.

Voor het verkrijgen van specifieke polyklonale antilichamen is een intact immuunsysteem, en daarmee een proefdier, nodig.

De kippen worden niet solitair gehuisvest (wat op zich voordelen voor de identificatie van de eieren zou hebben), maar met twee in een kooi om zo enigszins te gemoed te komen aan het sociale karakter van de kip (een groepsdier).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	51	1	2	36	1	1	01	01	1	1	3

Uw aanvraag 2011073.a, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

In de DEC-vergadering van 20 juni jl. is uw proef 'Opwekken van polyklonale antilichamen in de kip tegen Immune-related Lectin-Like Receptoren (ILLRs) van de karper (2011073.a))' besproken. De DEC is van mening dat het doel van de proef opweegt tegen het te verwachten matige ongerief dat de dieren ondergaan. Voorafgaand aan een definitief advies heeft de DEC de volgende vragen en opmerkingen: In verband met optimaal proefdiergebruik geeft de DEC u in overweging het bloed te verzamelen na afloop om te kijken of daar ook antilichamen in zitten.

Bovendien verzoekt de DEC u bij 6.c. (bronnen van ongerief) het euthanaseren toe te voegen.

Daarnaast heeft de DEC nog enkele tekstuele opmerkingen:

Bij 7. (maatregelen ter beperking van ongerief) geeft u aan dat afzondering van de kippen in verband met verzameling van de eieren noodzakelijk is. Dit is volgens de DEC onjuist en zij verzoekt u dit te wijzigen.

Tenslotte verzoekt de DEC u de tweede zin van 9. (alternatieven) te wijzigen, aangezien zij de formulering ("diervriendelijker alternatief") wat ongelukkig vindt (suggestie: "Er is gekozen voor kippen, aangezien bij kippen verzameling van antilichamen uit eieren plaatsvindt i.p.v. door frequente afname van (veel) bloed zoals dat bij konijnen gangbaar is").

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

Uw aanvraag 2011073.b, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de Secretaris DEC de status: 'Positief advies na behandeling DEC' gekregen.

De DEC is van mening dat het doel van de proef opweegt tegen het te verwachten matige ongerief dat de dieren ondergaan en dat de vraag m.b.t. alternatieven voldoende is beantwoord.

Met vriendelijke groet,


Secretaris DEC