

## Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:

Afdeling:

**Titel dierproef:** Effect van derde immunisatie via de respiratoire route op de specifieke humorale immuunrespons van de kip

**Aanmeldcode / Protocol:** 2008044.a

**Stadia van de proef:**

24-04-2008	Aangemeld	[REDACTED]
29-04-2008	Wijzigen	Secretaris van de DEC
29-04-2008	Gekopieerd	[REDACTED]

**Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja**

**Toelichting:**

Dit experiment is een vervolg in de reeks van experimenten 2003110.c, 2004041.b, 2002122.c, 2004072.f, en 2005051.b en 2006045b waarin homotopen intraveneus of intratracheaal werden toegediend en vervolgens de effecten van de homotopen op de immuunreacties tegen modelwitten werd gemeten. Dit experiment is besproken met prof. [REDACTED] en past goed in de lijn van onderzoek naar de aanpassing (adaptatie) van dieren aan huisvestingscondities.

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

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. van dieren

In deze proef zal nagegaan worden in hoeverre een derde intratracheale sensibilisatie met eiwitantigeen in combinatie met lipopolysacchariden aanleiding geeft tot een verandering van de specifieke antilichaamrespons danwel een innate immuunrespons (natuurlijke antilichamen) bij de kip. Bij een vorige proef (2006045b) zijn door het primair en herhaald (secundair) behandelen van legkippen met diverse combinaties van LPS en het modelantigeen humaan serum albumine (HuSA) een 16-tal groepen kippen gecreeerd (overgebleven) die verschillen in hun immunologische voorgeschiedenis. In dit experiment zullen deze groepen dieren allen een en dezelfde behandeling ondergaan, een behandeling uitgekozen uit de voorafgaande 16 combinaties, en zal nagegaan worden in hoeverre deze voorgeschiedenis een effect heeft op een derde challengecombinatie van LPS en HuSA. Tevens zal deze behandeling voor een van de 16 groepen de derde identieke behandeling zijn. Uit de voorgaande proef werd geconcludeerd dat de tweede identieke handeling over het algemeen leidde tot een verminderde gevoeligheid voor LPS. Dit ondersteunde de gedachte dat dieren kunnen adapteren aan of tegen de negatieve effecten van 'danger' signalen in het milieu zoals LPS. Dit experiment kan dus uitsluitel geven of de verminderde gevoeligheid zoals waargenomen na de tweede challenge doorzet in de derde challenge op latere leeftijd. Daarnaast zal informatie verkregen worden of het effect van de gecombineerde LPS/HuSA challenge zoals waargenomen op jongere leeftijd ook optreedt op oudere leeftijd, omdat in de gecreeerde 16 groepen zich groepen bevinden die deze combinatie van challenge pas op oudere leeftijd voor de eerste maal ondergaan. Het meten van modulatie van immuunreactiviteit via de luchtwegen en de mogelijke verschillen in gevoeligheid bij verschillende leeftijden of na herhaalde challenges kan een belangrijke bijdrage leveren aan het bevestigen van het vermoeden dat substanties in de lucht verantwoordelijk kunnen zijn voor de

immuunstatus/reactiviteit in het algemeen en pluimvee in het bijzonder, en invloedt uitoefenen op mechanismen die verantwoordelijk zijn voor diverse immuungerelateerde ziektes.

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

Zoals bij eerdere aanvragen is aangegeven wordt de mate van specifieke en daaraan voorafgaand de innate immuniteit bij mens en dier voor een belangrijke mate bepaald door verbindingen (homotopen) aanwezig in de microflora van de darm, en aanwezig in de omgeving (lucht). LPS, afkomstig van gramnegatieve bacterien, LTA, afkomstig van grampositieve bacterien, glucanen van schimmels, etc., binden aan Toll-like receptoren en skewen daarmee de afgifte van cytokines door antigeen presenterende cellen, die op hun beurt het specifieke immuunsysteem weer richting T-helper-1 (ontsteking) dan wel T-helper-2 (antilichaamrespons) kunnen sturen. Een overmatige sturing richting TH-1 of TH-2 kan vervolgens leiden tot verschillende vormen van immuunreacties. In het recente verleden hebben we pluimvee achtereenvolgens middels subcutane, intraveneuze, en uiteindelijk intratracheale routes gechallengeerd met homotopen als LPS, LTA, of beta glucanen, en vonden we ongeacht de route een sterke en meestal consistente modulatie van de specifieke immuunreactiviteit. Zo blijkt LPS over het algemeen de primaire humorale immuunrespons te verlagen, maar de secundaire humorale immuunrespons te verhogen tegen subcutaan aangeboden model-eiwitantigeen. In de natuurlijke situatie echter is aanbod van het immuunmodulerend agens (LPS) via de long, en een subcutaan aanbod van het antigeen (HuSA) waarschijnlijk niet conform de werkelijkheid en zal er eerder sprake zijn van een gecombineerde challenge in bijv. de long in de vorm van een bacterie-infectie waarin het immuunsysteem mogelijk tegen zowel de homotopen (LPS) als de eiwitantigenen van de bacterie kan reageren. Gelijktijdig aanbod op dezelfde locatie van homotoop en antigeen benadert waarschijnlijk dus veel beter de natuurlijke situatie van een respiratoire infectie of het effect van de omgeving (luchtkwaliteit) op de immuunstatus.

Een tweede belangrijke aspect van deze studie is dat de long een orgaan is dat via het mucosale immuunsysteem ook bij de kip waarschijnlijk een systeem met de darm vormt, maar waarvan bij de kip hoegenaamd niets bekend is. Aangenomen wordt dat net als bij zoogdieren er bij de kip geen longgeassocieerd lymfoid weefsel aanwezig is dat een immuunreactie tegen longpathogenen of -challenges kan induceren. Opmerkelijk is echter dat intratracheaal aangeboden LPS een vrijwel 'klassieke' primaire en klassieke antilichaamtiterverloop vertoonde! Dit laatste suggereerde dat a. in de respiratoire tractus van kippen wel degelijk immuunreacties opgeroepen kunnen worden, en b. dat het 'klassiek' T-celonaafhankelijke LPS wellicht via een hapteen-carrier mechanisme (waarbij LPS met een aanwezig eiwit een functioneel antigeen gaat vormen) tot de vorming van 'specifieke' antilichamen aanleiding geeft. Inductie van specifieke antilichamen in combinatie met bepaalde homotopen zou ten grondslag kunnen liggen aan T-helper-2 gemedieerde overgevoeligheidsreacties in de luchtwegen. Omdat bij voorafgaande studies uitgegaan is van optimale antilichaam-inducerende doses antigeen (1 mg HuSA per dier) of modulerende doses LPS (0.5 mg per dier), en we geen informatie hebben over de range van concentraties waarin LPS of HuSA aanleiding kunnen geven tot immuunreacties willen we in de vorm van een schaakbordtitratie nagaan welke combinatie van homotoop (LPS) en antigeen (HuSA) in de respiratoire tractus aanleiding geven tot welke mate van specifieke en innate immuunreactiviteit, m.a.w. welke combinaties van gelijktijdig aanbod geven aanleiding tot hogere danwel lagere immuunreacties vergeleken met het aanbod van of enkel LPS (doses) of enkel HuSA (doses).

\*\*\*Het gebrek aan kennis omtrent de doses verhoudingen LPS en eiwit is in zoverre relevant: a. omdat onbekend is welke doses LPS een individueel dier continu danwel bij een piekbelasting via de longen ondergaat: normaliter is de concentratie LPS in een kippenstal ongeveer 1 microgram per m<sup>3</sup> lucht, het volume dat een kip ademt per 24 uur. Het is echter zeer aannemelijk dat door het gedrag (stofbaden, pikken, eten, überhaupt bewegen) de ingeademde concentratie als piekbelasting veel hoger kan worden, zeker bij een grondhuisvesting met organisch materiaal). De dosis van 500 microgram per challenge zoals tot nu toe uitgevoerd berust op de in de literatuur algemeen aanvaarde dosis van 1 mg per kg lichaamsgewicht die bij pluimvee tot immuunmodulatoire en metabole effecten leidt. Recentelijk is ook naar voren gekomen dat effecten van verbindingen als LPS dusdanig concentratieafhankelijk zijn dat er door complexe feedbackmechanismen tegenovergestelde dan verwachte effecten optreden! Daarnaast is niet uit te sluiten dat LPS en eiwit als HuSA indien gelijktijdig op dezelfde locatie aangeboden een antagonistische of synergistische werking vertonen. In dit experiment zal de concentratie LPS in de lucht niet gemeten worden om 2 redenen: 1. de techniek is momenteel in Wageningen niet optimaal functionerend, in het verleden zijn

de Zodiac stallen wel doorgemeten en werden vergelijkbare concentraties als in de literatuur vermeld gemeten. Dit is op zich geen bezwaar omdat b. de belastingen nog steeds 50, 250 tot 500 maal de hoogst gepubliceerde concentraties te boven gaan.\*\*\*

Uit het experiment zoals hierboven uitgebreid ingeleid is (2006045b) kwam naar voren dat verschillende combinaties van 4 LPS concentraties en 4 HuSA concentraties tot opmerkelijke verschillen in reacties van de behandelde dieren leidde, maar binnen een behandeling de effecten van de 2e challenge over het algemeen minder waren dan de effecten van de eerste behandeling. Dit suggereert net als eerder werk dat dieren kunnen adapteren aan substantie als LPS in de lucht en als het ware een geheugen opbouwen tegen substanties als LPS, hoewel dat laatste immunologisch gezien vreemd is. In dit experiment willen we daarom uit de zestien combinaties van groepen er een kiezen om voor een derde maal, maar in dit geval aan alle dieren, toegepast te worden, om te bestuderen of de veronderstelde adaptatie doorzet, en in hoeverre een voorgeschiedenis van LPS/HuSA challenge (primaire en secundaire challenge) bepalend is voor een derde (maar wellicht ander niveau van ) challenge met LPS/HuSA.

### **1.c. Lekensamenvatting:**

## **2. Gepland vanaf: 01-07-2008 tot 01-08-2008**

### **3. Specificatie diergroepen:**

1	10	kippen
2	10	kippen
3	10	kippen
4	10	kippen
5	10	kippen
6	10	kippen
7	10	kippen
8	10	kippen
9	10	kippen
10	10	kippen
11	10	kippen
12	10	kippen
13	10	kippen
14	10	kippen
15	10	kippen
16	10	kippen

### **4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:**

We zullen gebruik maken van LSL (Lohman) witte legkippen (White Leghorn achtergrond) uit het experiment 2006045b. Deze dieren zijn inmiddels 8-9 maanden oud.

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

Dit experiment is een vervolg op de experimenten 2006045b waarin LPS en HuSA in verschillende (16) combinaties intratracheaal werd toegediend aan kippen, en vervolgens de primaire en secundaire immunreacties tegen HuSA werd gemeten. In dit geval zal weer de immunreactie tegen HuSA worden gemeten. Ook dit experiment zal naar verwachting bijdragen aan het toetsen van de hypothese dat huisvestingsomstandigheden (hygiëne (LPS) en antigene druk (HuSA)) via de lucht een belangrijk effect uitoefent op het immuunsysteem van de kip (en andere landbouwhuisdieren), maar kan naar alle waarschijnlijkheid ook een uitspraak over adaptatie en leeftijd gedaan worden.

### **4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:**

Voor tien dieren per behandelingsgroep is eerder (2006045b) gekozen, op grond van eerder opgedane ervaring met de mate van variatie in immunreactiviteit van outbred dieren en de modulerende werking van homotopen als LPS

#### 4.d. Herkomst:

- 1 E. andere herkomst
- 2 E. andere herkomst
- 3 E. andere herkomst
- 4 E. andere herkomst
- 5 E. andere herkomst
- 6 E. andere herkomst
- 7 E. andere herkomst
- 8 E. andere herkomst
- 9 E. andere herkomst
- 10 E. andere herkomst
- 11 E. andere herkomst
- 12 E. andere herkomst
- 13 E. andere herkomst
- 14 E. andere herkomst
- 15 E. andere herkomst
- 16 E. andere herkomst

#### Toelichting:

Honderd en zestig LSL Lohman kippen 8-9 maanden leeftijd afkomstig uit proef 2006045b zullen worden gebruikt.

#### 5.a. Accommodatie:

ruimte in overleg met proefdieraccommodatie, dieren zijn per behandeling in groepshuisvesting op de grond gehuisvest. Groepen zullen kwa samenstelling niet veranderd worden.

#### 5.b. Huisvesting & Verzorging:

Normaal voor legpluimvee, inclusief standaardvaccinatie procedures

#### 5.c. Voeding:

Voeding en drinkwater is ad lib. Standaard opfokvoer voor legpluimvee.

#### 6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De 160 dieren zijn eerder op 6/7 weken leeftijd in 16 groepen verdeeld (n = 10 dieren per groep), en hebben de volgende behandelingen (proef 2006045b) ondergaan:

Op twee achtereenvolgende dagen werd intratracheaal op 6/7 weken leeftijd toegediend:

Groep 1: 0.5 ml PBS met 0.5 mg HuSA en 0.5 mg LPS

Groep 2: 0.5 ml PBS met 0.5 mg HuSA en 0.25 mg LPS

Groep 3: 0.5 ml PBS met 0.5 mg HuSA en 0.05 mg LPS

Groep 4: 0.5 ml PBS met 0.5 mg HuSA en 0 mg LPS

Groep 5: 0.5 ml PBS met 0.25 mg HuSA en 0.5 mg LPS

Groep 6: 0.5 ml PBS met 0.25 mg HuSA en 0.25 mg LPS

Groep 7: 0.5 ml PBS met 0.25 mg HuSA en 0.05 mg LPS

Groep 8: 0.5 ml PBS met 0.25 mg HuSA en 0 mg LPS

Groep 9: 0.5 ml PBS met 0.05 mg HuSA en 0.5 mg LPS

Groep 10: 0.5 ml PBS met 0.05 mg HuSA en 0.25 mg LPS

Groep 11: 0.5 ml PBS met 0.05 mg HuSA en 0.05 mg LPS

Groep 12: 0.5 ml PBS met 0.05 mg HuSA en 0 mg LPS

Groep 13: 0.5 ml PBS met 0 mg HuSA en 0.5 mg LPS

Groep 14: 0.5 ml PBS met 0 mg HuSA en 0.25 mg LPS

Groep 15: 0.5 ml PBS met 0 mg HuSA en 0.05 mg LPS

Groep 16: 0.5 ml PBS met 0 mg HuSA en 0 mg LPS

\*\*\*In deze opzet werd in de groepen 1,2,3,5,6,7,9,10,11 het effect van een gelijktijdige challenge met eiwit (doses) en LPS getoetst. De groepen 4,8, en 12 toetsten het effect van alleen een eiwit sensibilisatie in afwezigheid van het potentieel immuunmodulerende LPS. De groepen 13-15 toetsten het effect van LPS sensu stricto op immuuncompetentie, groep 16 was de algemene controlegroep. De dieren werden op twee achtereenvolgende dagen i.t. gechallengeed. In principe is een 1-malige LPS challenge reeds voldoende, maar door een risico van orale challenge of terughoesten die nooit helemaal uit te sluiten is kan de beoogde belasting soms niet bereikt worden. In alle groepen waaraan geen LPS werd toegediend: 4, 8, 12, en 16 werd een antistoftiter gericht tegen LPS gemeten. De sterkte/hoogte daarvan illustreert de achtergrondbelasting met LPS in de stal

Op een leeftijd van 11/12 weken werden de groepen volgens hetzelfde schema behandeld.

In het huidige nieuw voorgestelde experiment zal de behandeling van Groep 10: 2 x 0.5 ml PBS met 0.05 mg HuSA en 0.25 mg LPS op alle dieren van alle groepen toegepast worden. Dit betekent dat groep 10 voor de derde maal dezelfde challenge ondergaat, en de andere 15 groepen in principe een andere voorgeschiedenis hebben wat van invloed kan zijn op de reactie tegen deze derde challenge. Groep 16 is een 'naieve' groep die dus op oudere leeftijd voor de eerste maal experimenteel in contact komt met deze vorm van LPS/HuSa challenge, to.v. andere groepen.

Bloedafnames (1 ml vanuit een vleugelvene) zullen worden uitgevoerd voor (dag 0) de intratracheale challenges, en vervolgens dag +3, +7, +14, +21, en +28 na de tertiaire challenge. \*\*\*Deze wekelijkse bloedafnames hebben naar beste weten geen effect op het verloop van de titerontwikkeling of immuunrespons\*\*\*. De dieren zullen wekelijks worden gewogen gelijktijdig met de bloedafnames, en de 1e dag na de 1e intratracheale challenge om het effect van LPS te meten. De dieren blijven in dezelfde groepshuisvesting (per behandeling) gehuisvest als in experiment 2006045b. Middels ELISA zal de titer van anti-HuSA antistoffen en anti-LPS antistoffen gemeten worden, en de aanwezige antistoftiters tegen bedrijfsvaccinaties (ILT, NCD, IB, en IBDV), eventueel in de vorm van isotypen IgG, IgM of IgA.

Zootechnische parameters: eileg, windeieren, lichaamsgewicht zullen worden bijgehouden.

#### 6.b. Mate van ongerief:

1	D. Matig/Ernstig
2	D. Matig/Ernstig
3	D. Matig/Ernstig
4	D. Matig/Ernstig
5	D. Matig/Ernstig
6	D. Matig/Ernstig
7	D. Matig/Ernstig
8	D. Matig/Ernstig
9	D. Matig/Ernstig
10	D. Matig/Ernstig
11	D. Matig/Ernstig
12	D. Matig/Ernstig
13	D. Matig/Ernstig
14	D. Matig/Ernstig
15	D. Matig/Ernstig
16	D. Matig/Ernstig

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

De dosis LPS I(2 x 0.25 mg) leidt waarschijnlijk niet tot een langdurige aantasting van gezondheid of welzijn. Op korte termijn zal er wel sprake zijn van een cachetine reactie. Naar verwachting zal ook de doses van HuSA (0.1 mg) geen aanleiding geven tot ernstige aantasting van welzijn. \*\*\*Overig ongerief bestaat uit het regelmatig afnemen van bloed, en het wegen (handelen/vangen) van de dieren\*\*\*.

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

### Anesthesie:

- 1 A. Niet toegepast (geen aanleiding).
- 2 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 3 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 4 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 5 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 6 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 7 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 8 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 9 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 10 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 11 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 12 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 13 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 14 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 15 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 16 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).

### Pijnbestrijding:

- 1 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 2 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 3 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 4 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 5 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 6 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 7 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 8 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 9 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 10 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 11 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 12 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 13 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 14 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 15 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 16 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Tertiaire challenge: dierbehandeling: 2 x intratracheale challenge met LPS en/of HuSA. Vervolgens regelmatige bloedafname. Het intratracheaal toedienen en bloedafnemen wordt door ervaren personeel uitgevoerd, en heeft an sich geen merkbare uitwerking op de gezondheid en welzijn van de dieren. De LPS zal bij de gekozen dosis van 2 x 0.25 mg aanleiding geven tot een 'acute fase-like reactie': passief gedrag, gewichtsafname, maar dat zal niet langer dan 24-48 uur duren. Uit eerder onderzoek kwam bovendien naar voren dat dergelijke dieren beter beschermd blijken tegen een tweede LPS challenge. \*\*\*Bloedafnames worden door ervaren personeel verricht: Niewland, De Vries Reilingh, proefdierverzorgers van de accommodatie, Parmentier, hetgeen de kans op de vorming van hematomen aanmerkelijk verlaagt\*\*\*.

## 8. Toestand van dieren na einde van de proef:

- 1 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 2 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 3 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 4 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 5 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 6 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 7 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 8 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 9 Het dier is gedood na het einde van de proef.

- 10 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 11 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 12 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 13 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 14 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 15 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 16 Het dier is gedood na het einde van de proef.

**Toelichting:**

Na afloop van de proef (dag 28 na tertiaire challenge) zullen de dieren worden geëuthaniseerd middels T61.

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

De behandelingen van de dieren in dit experiment zijn gebaseerd op het eerder uitgevoerde experiment 2006045b waarin LPS en HuSA gezamenlijk intratracheaal werd aangeboden. Net als in dit experiment wordt gekozen voor een tweevoudige challenge voor de tertiaire immunrespons. Studie naar het effect van homotopen op het immuunsysteem vereist het bestuderen van levende dieren. De aantallen (10 dieren per voorbehandelingsbehandelingsgroep) berusten op de waarneming dat bij de eerder genoemde experimenten deze aantallen voldoende bleken om op grond van de variatie statistisch significante verschillen te vinden en de kans op toevalstreffers beperkt is. Bij het laatste experiment (2006045b) bleek geen sprake van een verhoogd risico op sterfte of verminderd welzijn van de dieren t.g.v. de LPS challenge. De dieren werden op een leeftijd van 6/7 weken primair gechallengeed, gevolgd door een secundaire identieke challenge 5 weken later. Inmiddels zijn deze dieren 7-8 maanden ouder voordat zij de tertiaire challenge ondergaan.

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



**Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2008044.a (K14):**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					36	1	1	01					
1	1	51	5	10					07	1	1	4	2
2	1	51	5	10					07	2	1	4	2
3	1	51	5	10					07	2	1	4	2
4	1	51	5	10					07	2	1	4	2
5	1	51	5	10					07	2	1	4	2
6	1	51	5	10					07	2	1	4	2
7	1	51	5	10					07	2	1	4	2
8	1	51	5	10					07	2	1	4	2
9	1	51	5	10					07	2	1	4	2
10	1	51	5	10					07	2	1	4	2
11	1	51	5	10					07	2	1	4	2
12	1	51	5	10					07	2	1	4	2
13	1	51	5	10					07	2	1	4	2
14	1	51	5	10					07	2	1	4	2
15	1	51	5	10					07	2	1	4	2
16	1	51	5	10					07	2	1	4	2

## Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:  
Afdeling:

**Titel dierproef:** Effect van derde immunisatie via de respiratoire route op de specifieke humorale immuunrespons van de kip

**Aanmeldcode / Protocol:** 2008044.b

**Stadia van de proef:**

29-04-2008	Aangemeld	
29-04-2008	Goedgekeurd	Secretaris van de DEC

**Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja**

**Toelichting:**

Dit experiment is een vervolg in de reeks van experimenten 2003110.c, 2004041.b, 2002122.c, 2004072.f, en 2005051.b en een uitbreiding van 2006045b waarin homotopen/dangersignalen intraveneus of intratracheaal werden toegediend en vervolgens de effecten van de homotopen op de immuunreacties tegen modelwitten werd gemeten. Dit experiment is besproken met [redacted] en past goed in de lijn van onderzoek naar de aanpassing (adaptatie) van dieren aan huisvestingscondities.

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

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. van dieren

In deze proef (een uitbreiding van proef 2006045b) zal nagegaan worden in hoeverre een derde intratracheale sensibilisatie met eiwitantigeen in combinatie met lipopolysacchariden aanleiding geeft tot een verandering van de specifieke antilichaamrespons danwel een innate immuunrespons (natuurlijke antilichamen) bij de kip. Bij vorige fases van deze proef (2006045b) zijn door het primair en herhaald (secundair) behandelen van legkippen met diverse combinaties van LPS en het modelantigeen humaan serum albumine (HuSA) een 16-tal groepen kippen gecreeerd (overgebleven) die verschillen in hun immunologische voorgeschiedenis. In dit deel van het experiment zullen deze groepen dieren allen een en dezelfde behandeling ondergaan, een behandeling uitgekozen uit de voorafgaande 16 combinaties, en zal nagegaan worden in hoeverre deze voorgeschiedenis een effect heeft op een derde challengecombinatie van LPS en HuSA. Tevens zal deze behandeling voor een van de 16 groepen de derde identieke behandeling zijn. Uit de voorgaande onderdelen van de proef werd geconcludeerd dat de tweede identieke handeling over het algemeen leidde tot een verminderde gevoeligheid voor LPS. Dit ondersteunde de gedachte dat dieren kunnen adapteren aan of tegen de negatieve effecten van 'danger' signalen in het milieu zoals LPS. Dit experiment kan dus uitsluitsel geven of de verminderde gevoeligheid zoals waargenomen na de tweede challenge doorzet in de derde challenge op latere leeftijd. Daarnaast zal informatie verkregen worden of het effect van de gecombineerde LPS/HuSA challenge zoals waargenomen op jongere leeftijd ook optreedt op oudere leeftijd, omdat in de gecreeerde 16 groepen zich groepen bevinden die deze combinatie van challenge pas op oudere leeftijd voor de eerste maal ondergaan. Het meten van modulatie van immuunreactiviteit via de luchtwegen en de mogelijke verschillen in gevoeligheid bij verschillende leeftijden of na herhaalde challenges kan een belangrijke



bijdrage leveren aan het bevestigen van het vermoeden dat substanties in de lucht verantwoordelijk kunnen zijn voor de immunestatus/reactiviteit in het algemeen en pluimvee in het bijzonder, en invloed uitoefenen op mechanismen die verantwoordelijk zijn voor diverse immuungerelateerde ziektes.

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

Zoals bij eerdere aanvragen is aangegeven wordt de mate van specifieke en daaraan voorafgaand de innate immuniteit bij mens en dier voor een belangrijke mate bepaald door verbindingen (homotopen) aanwezig in de microflora van de darm, en aanwezig in de omgeving (lucht). LPS, afkomstig van gramnegatieve bacterien, LTA, afkomstig van grampositieve bacterien, glucanen van schimmels, etc., binden aan Toll-like receptoren en skewen daarmee de afgifte van cytokines door antigeen presenterende cellen, die op hun beurt het specifieke immuunsysteem weer richting T-helper-1 (ontsteking) dan wel T-helper-2 (antilichaamrespons) kunnen sturen. Een overmatige sturing richting TH-1 of TH-2 kan vervolgens leiden tot verschillende vormen van immuunreacties. In het recente verleden hebben we pluimvee achtereenvolgens middels subcutane, intraveneuze, en uiteindelijk intratracheale routes gechallengeerd met homotopen als LPS, LTA, of beta glucanen, en vonden we ongeacht de route een sterke en meestal consistente modulatie van de specifieke immuunreactiviteit. Zo blijkt LPS over het algemeen de primaire humorale immuunrespons te verlagen, maar de secundaire humorale immuunrespons te verhogen tegen subcutaan aangeboden model-eiwit-antigenen. In de natuurlijke situatie echter is aanbod van het immuunmodulerend agens (LPS) via de long, en een subcutaan aanbod van het antigeen (HuSA) waarschijnlijk niet conform de werkelijkheid en zal er eerder sprake zijn van een gecombineerde challenge in bijv. de long in de vorm van een bacterie-infectie waarin het immuunsysteem mogelijk tegen zowel de homotopen (LPS) als de eiwit-antigenen van de bacterie kan reageren. Gelijktijdig aanbod op dezelfde locatie van homotoop en antigeen benadert waarschijnlijk dus veel beter de natuurlijke situatie van een respiratoire infectie of het effect van de omgeving (luchtkwaliteit) op de immunestatus.

Een tweede belangrijke aspect van deze studie is dat de long een orgaan is dat via het mucosale immuunsysteem ook bij de kip waarschijnlijk een systeem met de darm vormt, maar waarvan bij de kip hoegenaamd niets bekend is. Aangenomen wordt dat net als bij zoogdieren er bij de kip geen longgeassocieerd lymfoid weefsel aanwezig is dat een immuunreactie tegen longpathogenen of -challenges kan induceren. Opmerkelijk is echter dat intratracheaal aangeboden LPS een vrijwel 'klassieke' primaire en klassieke antilichaamtiterverloop vertoonde! Dit laatste suggereerde dat a. in de respiratoire tractus van kippen wel degelijk immuunreacties opgeroepen kunnen worden, en b. dat het 'klassiek' T-cel-onafhankelijke LPS wellicht via een haptene-carrier mechanisme (waarbij LPS met een aanwezig eiwit een functioneel antigeen gaat vormen) tot de vorming van 'specifieke' antilichamen aanleiding geeft. Inductie van specifieke antilichamen in combinatie met bepaalde homotopen zou ten grondslag kunnen liggen aan T-helper-2 gemedieerde overgevoelighedsreacties in de luchtwegen. Omdat bij voorafgaande studies uitgegaan is van optimale antilichaam-inducerende doses antigeen (1 mg HuSA per dier) of modulerende doses LPS (0.5 mg per dier), en we geen informatie hebben over de range van concentraties waarin LPS of HuSA aanleiding kunnen geven tot immuunreacties willen we in de vorm van een schaaftitratie nagaan welke combinatie van homotoop (LPS) en antigeen (HuSA) in de respiratoire tractus aanleiding geven tot welke mate van specifieke en innate immuunreactiviteit, m.a.w. welke combinaties van gelijktijdig aanbod geven aanleiding tot hogere dan wel lagere immuunreacties vergeleken met het aanbod van of enkel LPS (doses) of enkel HuSA (doses).

\*\*\*Het gebrek aan kennis omtrent de doses verhoudingen LPS en eiwit is in zoverre relevant: a. omdat onbekend is welke doses LPS een individueel dier continu danwel bij een piekbelasting via de longen ondergaat: normaliter is de concentratie LPS in een kippenstal ongeveer 1 microgram per m<sup>3</sup> lucht, het volume dat een kip ademt per 24 uur. Het is echter zeer aannemelijk dat door het gedrag (stofbaden, pikken, eten, überhaupt bewegen) de ingeademde concentratie als piekbelasting veel hoger kan worden, zeker bij een grondhuisvesting met organisch materiaal). De dosis van 500 microgram per challenge zoals tot nu toe uitgevoerd berust op de in de literatuur algemeen aanvaarde dosis van 1 mg per kg lichaamsgewicht die bij pluimvee tot immuunmodulatoire en metabole effecten leidt. Recentelijk is ook naar voren gekomen dat effecten van verbindingen als LPS dusdanig concentratieafhankelijk zijn dat er door complexe feedbackmechanismen tegenovergestelde dan verwachte effecten optreden! Daarnaast is niet uit te sluiten dat LPS en eiwit als HuSA indien gelijktijdig op dezelfde locatie aangeboden een

antagonistische of synergistische werking vertonen. In dit experiment zal de concentratie LPS in de lucht niet gemeten worden om 2 redenen: 1. de techniek is momenteel in Wageningen niet optimaal functionerend, in het verleden zijn de Zodiac stallen wel doorgemeten en werden vergelijkbare concentraties als in de literatuur vermeld gemeten. Dit is op zich geen bezwaar omdat b. de belastingen nog steeds 50, 250 tot 500 maal de hoogst gepubliceerde concentraties te boven gaan.\*\*\*

Uit het experiment zoals hierboven uitgebreid ingeleid is (2006045b) kwam naar voren dat verschillende combinaties van 4 LPS concentraties en 4 HuSA concentraties tot opmerkelijke verschillen in reacties van de behandelde dieren leidde, maar binnen een behandeling de effecten van de 2e challenge over het algemeen minder waren dan de effecten van de eerste behandeling. Dit suggereert net als eerder werk dat dieren kunnen adapteren aan substantie als LPS in de lucht en als het ware een geheugen opbouwen tegen substanties als LPS, hoewel dat laatste immunologisch gezien vreemd is. In deze uitbreiding van dit experiment willen we daarom uit de zestien combinaties van groepen er een kiezen om voor een derde maal, maar in dit geval aan alle dieren, toegepast te worden, om te bestuderen of de veronderstelde adaptatie doorzet, en in hoeverre een voorgeschiedenis van LPS/HuSA challenge (primaire en secundaire challenge) bepalend is voor een derde (maar wellicht ander niveau van ) challenge met LPS/HuSA.

### **1.c. Lekensamenvatting:**

**2. Gepland vanaf: 01-07-2008 tot 01-08-2008**

### **3. Specificatie diergroepen:**

1	10	kippen
2	10	kippen
3	10	kippen
4	10	kippen
5	10	kippen
6	10	kippen
7	10	kippen
8	10	kippen
9	10	kippen
10	10	kippen
11	10	kippen
12	10	kippen
13	10	kippen
14	10	kippen
15	10	kippen
16	10	kippen

### **4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:**

We zullen gebruik maken van LSL (Lohman) witte legkippen (White Leghorn achtergrond) uit het experiment 2006045b. Deze dieren zijn inmiddels 8-9 maanden oud.

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

Dit experiment is een uitbreiding van experiment 2006045b waarin LPS en HuSA in verschillende (16) combinaties intratracheaal werd toegediend aan kippen, en vervolgens de primaire en secundaire immuunreacties tegen HuSA werd gemeten. In dit geval zal weer de immuunreactie tegen HuSA worden gemeten. Ook dit onderdeel van het experiment zal naar verwachting bijdragen aan het toetsen van de hypothese dat huisvestingsomstandigheden (hygiëne (LPS) en antigene druk (HuSA)) via de lucht een belangrijk effect uitoefent op het immuunsysteem van de kip (en andere landbouwhuisdieren), maar kan naar alle waarschijnlijkheid ook een uitspraak over adaptatie en leeftijd gedaan worden.

### **4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:**

Voor tien dieren per behandelingsgroep is eerder (2006045b) gekozen, op grond van eerder opgedane

ervaring met de mate van variatie in immuunreactiviteit van outbred dieren en de modulerende werking van homotopen als LPS

**4.d. Herkomst:**

- 1 E. andere herkomst
- 2 E. andere herkomst
- 3 E. andere herkomst
- 4 E. andere herkomst
- 5 E. andere herkomst
- 6 E. andere herkomst
- 7 E. andere herkomst
- 8 E. andere herkomst
- 9 E. andere herkomst
- 10 E. andere herkomst
- 11 E. andere herkomst
- 12 E. andere herkomst
- 13 E. andere herkomst
- 14 E. andere herkomst
- 15 E. andere herkomst
- 16 E. andere herkomst

**Toelichting:**

Honderd en zestig LSL Lohman kippen 8-9 maanden leeftijd afkomstig uit proef 2006045b zullen worden gebruikt.

**5.a. Accommodatie:** [REDACTED]

ruimte in overleg met proefdieraccommodatie, dieren zijn per behandeling in groepshuisvesting op de grond gehuisvest. Groepen zullen kwa samenstelling niet veranderd worden.

**5.b. Huisvesting & Verzorging:**

Normaal voor legpluimvee, inclusief standaardvaccinatie procedures

**5.c. Voeding:**

Voeding en drinkwater is ad lib. Standaard opfokvoer voor legpluimvee.

**6.a. Proefschema / proefbehandelingen:**

De 160 dieren zijn eerder op 6/7 weken leeftijd in 16 groepen verdeeld (n = 10 dieren per groep), en hebben de volgende behandelingen (proef 2006045b) ondergaan:

Op twee achtereenvolgende dagen werd intratracheaal op 6/7 weken leeftijd toegediend:

- Groep 1: 0.5 ml PBS met 0.5 mg HuSA en 0.5 mg LPS
- Groep 2: 0.5 ml PBS met 0.5 mg HuSA en 0.25 mg LPS
- Groep 3: 0.5 ml PBS met 0.5 mg HuSA en 0.05 mg LPS
- Groep 4: 0.5 ml PBS met 0.5 mg HuSA en 0 mg LPS

- Groep 5: 0.5 ml PBS met 0.25 mg HuSA en 0.5 mg LPS
- Groep 6: 0.5 ml PBS met 0.25 mg HuSA en 0.25 mg LPS
- Groep 7: 0.5 ml PBS met 0.25 mg HuSA en 0.05 mg LPS
- Groep 8: 0.5 ml PBS met 0.25 mg HuSA en 0 mg LPS

- Groep 9: 0.5 ml PBS met 0.05 mg HuSA en 0.5 mg LPS
- Groep 10: 0.5 ml PBS met 0.05 mg HuSA en 0.25 mg LPS
- Groep 11: 0.5 ml PBS met 0.05 mg HuSA en 0.05 mg LPS
- Groep 12: 0.5 ml PBS met 0.05 mg HuSA en 0 mg LPS

- Groep 13: 0.5 ml PBS met 0 mg HuSA en 0.5 mg LPS
- Groep 14: 0.5 ml PBS met 0 mg HuSA en 0.25 mg LPS

Groep 15: 0.5 ml PBS met 0 mg HuSA en 0.05 mg LPS  
Groep 16: 0.5 ml PBS met 0 mg HuSA en 0 mg LPS

\*\*\*In deze opzet werd in de groepen 1,2,3,5,6,7,9,10,11 het effect van een gelijktijdige challenge met eiwit (doses) en LPS getoetst. De groepen 4,8, en 12 toetsten het effect van alleen een eiwit sensibilisatie in afwezigheid van het potentieel immuunmodulerende LPS. De groepen 13-15 toetsten het effect van LPS sensu stricto op immuuncompetentie, groep 16 was de algemene controlegroep. De dieren werden op twee achtereenvolgende dagen i.t. gechallengeed. In principe is een 1-malige LPS challenge reeds voldoende, maar door een risico van orale challenge of terughoesten die nooit helemaal uit te sluiten is kan de beoogde belasting soms niet bereikt worden. In alle groepen waaraan geen LPS werd toegediend: 4, 8, 12, en 16 werd een antistoftiter gericht tegen LPS gemeten. De sterkte/hoogte daarvan illustreert de achtergrondbelasting met LPS in de stal

Op een leeftijd van 11/12 weken werden de groepen volgens hetzelfde schema behandeld.

In het huidige nieuw voorgestelde experiment zal de behandeling van Groep 10: 2 x 0.5 ml PBS met 0.05 mg HuSA en 0.25 mg LPS op alle dieren van alle groepen toegepast worden. Dit betekent dat groep 10 voor de derde maal dezelfde challenge ondergaat, en de andere 15 groepen in principe een andere voorgeschiedenis hebben wat van invloed kan zijn op de reactie tegen deze derde challenge. Groep 16 is een 'naieve' groep die dus op oudere leeftijd voor de eerste maal experimenteel in contact komt met deze vorm van LPS/HuSa challenge, to.v. andere groepen.

Bloedafnames (1 ml vanuit een vleugelvene) zullen worden uitgevoerd voor (dag 0) de intratracheale challenges, en vervolgens dag +3, +7, +14, +21, en +28 na de tertiaire challenge. \*\*\*Deze wekelijkse bloedafnames hebben naar beste weten geen effect op het verloop van de titerontwikkeling of immuunrespons\*\*\*. De dieren zullen wekelijks worden gewogen gelijktijdig met de bloedafnames, en de 1e dag na de 1e intratracheale challenge om het effect van LPS te meten. De dieren blijven in dezelfde groepshuisvesting (per behandeling) gehuisvest als in experiment 2006045b. Middels ELISA zal de titer van anti-HuSA antistoffen en anti-LPS antistoffen gemeten worden, en de aanwezige antistoftiters tegen bedrijfsvaccinaties (ILT, NCD, IB, en IBDV), eventueel in de vorm van isotypen IgG, IgM of IgA.

Zootechnische parameters: eileg, windeieren, lichaamsgewicht zullen worden bijgehouden.

#### 6.b. Mate van ongerief:

- |    |                  |
|----|------------------|
| 1  | D. Matig/Ernstig |
| 2  | D. Matig/Ernstig |
| 3  | D. Matig/Ernstig |
| 4  | D. Matig/Ernstig |
| 5  | D. Matig/Ernstig |
| 6  | D. Matig/Ernstig |
| 7  | D. Matig/Ernstig |
| 8  | D. Matig/Ernstig |
| 9  | D. Matig/Ernstig |
| 10 | D. Matig/Ernstig |
| 11 | D. Matig/Ernstig |
| 12 | D. Matig/Ernstig |
| 13 | D. Matig/Ernstig |
| 14 | D. Matig/Ernstig |
| 15 | D. Matig/Ernstig |
| 16 | D. Matig/Ernstig |

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

De dosis LPS (2 x 0.25 mg) leidt waarschijnlijk niet tot een langdurige aantasting van gezondheid of welzijn. Op korte termijn zal er wel sprake zijn van een cachetine reactie. Naar verwachting zal ook de

doses van HuSA (0.1 mg) geen aanleiding geven tot ernstige aantasting van welzijn. \*\*\*Overig ongerief bestaat uit het regelmatig afnemen van bloed, en het wegen (handelen/vangen) van de dieren\*\*\*.

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

##### Anesthesie:

- 1 A. Niet toegepast (geen aanleiding).
- 2 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 3 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 4 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 5 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 6 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 7 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 8 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 9 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 10 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 11 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 12 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 13 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 14 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 15 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).
- 16 B. Niet toegepast (onverenigbaar met de proef).

##### Pijnbestrijding:

- 1 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 2 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 3 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 4 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 5 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 6 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 7 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 8 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 9 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 10 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 11 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 12 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 13 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 14 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 15 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- 16 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Tertiaire challenge: dierbehandeling: 2 x intratracheale challenge met LPS en/of HuSA. Vervolgens regelmatige bloedafname. Het intratracheaal toedienen en bloedafnemen wordt door ervaren personeel uitgevoerd, en heeft an sich geen merkbare uitwerking op de gezondheid en welzijn van de dieren. De LPS zal bij de gekozen dosis van 2 x 0.25 mg aanleiding geven tot een 'acute fase-like reactie': passief gedrag, gewichtsafname, maar dat zal niet langer dan 24-48 uur duren. Uit eerder onderzoek kwam bovendien naar voren dat dergelijke dieren beter beschermd blijken tegen een tweede LPS challenge.

\*\*\*Bloedafnames worden door ervaren personeel verricht: [REDACTED], proefdierversorgers van de accommodatie, [REDACTED], hetgeen de kans op de vorming van hematomen aanmerkelijk verlaagt\*\*\*.

#### 8. Toestand van dieren na einde van de proef:

- 1 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 2 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 3 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 4 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 5 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 6 Het dier is gedood na het einde van de proef.

- 7 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 8 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 9 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 10 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 11 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 12 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 13 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 14 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 15 Het dier is gedood na het einde van de proef.
- 16 Het dier is gedood na het einde van de proef.

**Toelichting:**

Na afloop van de proef (dag 28 na tertiaire challenge) zullen de dieren worden geëuthaniseerd middels T61.

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

De behandelingen van de dieren in dit experiment zijn gebaseerd op de eerder uitgevoerde onderdelen van experiment 2006045b waarin LPS en HuSA gezamenlijk intratracheaal werd aangeboden. Net als in dit experiment wordt gekozen voor een tweevoudige challenge voor de tertiaire immunrespons. Studie naar het effect van homotopen op het immuunsysteem vereist het bestuderen van levende dieren. De aantallen (10 dieren per voorbehandelingsbehandelingsgroep) berusten op de waarneming dat bij de eerder genoemde experimenten deze aantallen voldoende bleken om op grond van de variatie statistisch significante verschillen te vinden en de kans op toevalstreffers beperkt is. Bij het laatste experiment (2006045b) bleek geen sprake van een verhoogd risico op sterfte of verminderd welzijn van de dieren t.g.v. de LPS challenge. De dieren werden op een leeftijd van 6/7 weken primair gechallengeed, gevolgd door een secundaire identieke challenge 5 weken later. Inmiddels zijn deze dieren 7-8 maanden ouder voordat zij de tertiaire challenge ondergaan.

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



**Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2008044.b (K14):**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					36	1	1	01					
1	1	51	5	10					07	1	1	4	2
2	1	51	5	10					07	2	1	4	2
3	1	51	5	10					07	2	1	4	2
4	1	51	5	10					07	2	1	4	2
5	1	51	5	10					07	2	1	4	2
6	1	51	5	10					07	2	1	4	2
7	1	51	5	10					07	2	1	4	2
8	1	51	5	10					07	2	1	4	2
9	1	51	5	10					07	2	1	4	2
10	1	51	5	10					07	2	1	4	2
11	1	51	5	10					07	2	1	4	2
12	1	51	5	10					07	2	1	4	2
13	1	51	5	10					07	2	1	4	2
14	1	51	5	10					07	2	1	4	2
15	1	51	5	10					07	2	1	4	2
16	1	51	5	10					07	2	1	4	2

Uw aanvraag 2008044.a, 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,



Secretaris DEC

---

Uw aanvraag 2008044.b, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Goedgekeurd' gekregen.

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

Met vriendelijke groet,



Secretaris DEC