

- year follow-up study. *Parkinsonism Relat Disord* 2005;11(3):157-165.
4. Hamani C, Saint-Cyr JA, Fraser J, Kaplitt M, Lozano AM. The subthalamic nucleus in the context of movement disorders. *Brain* 2004;127(Pt 1):4-20.
  5. Temel Y, Visser-Vandewalle V, Aendekerk B, Rutten B, Tan S, Scholtissen B, et al. Acute and separate modulation of motor and cognitive performance in parkinsonian rats by bilateral stimulation of the subthalamic nucleus. *Exp Neurol* 2005;193(1):43-52.
  6. Kim M-R, Yun JY, Jeon B, Lim YH, Kim KR, Yang H-J, et al. Patients' reluctance to undergo deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders* 2016;23:91-94.
  7. Berney A, Vingerhoets F, Perrin A, Guex P, Villemure JG, Burkhard PR, et al. Effect on mood of subthalamic DBS for Parkinson's disease: a consecutive series of 24 patients. *Neurology* 2002;59(9):1427-1429.
  8. Houeto JL, Mesnage V, Mallet L, Pillon B, Gargiulo M, du Moncel ST, et al. Behavioural disorders, Parkinson's disease and subthalamic stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;72(6):701-707.
  9. Temel Y, Kessels A, Tan S, Topdag A, Boon P, Visser-Vandewalle V. Behavioural changes after bilateral subthalamic stimulation in advanced Parkinson disease: A systematic review. *Parkinsonism & Related Disorders* 2006;12(5):265-272.
  10. Troster AI, Fields JA, Wilkinson S, Pahwa R, Koller WC, Lyons KE. Effect of motor improvement on quality of life following subthalamic stimulation is mediated by changes in depressive symptomatology. *Stereotact Funct Neurosurg* 2003;80(1-4):43-47.
  11. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997;389(6653):816-824.
  12. Dhaka A, Viswanath V, Patapoutian A. Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci* 2006;29:135-161.
  13. Cho H, Oh U. Anoctamin 1 Mediates Thermal Pain as a Heat Sensor. *Current Neuropharmacology* 2013;11(6):641-651.
  14. Chen R, Romero G, Christiansen MG, Mohr A, Anikeeva P. Wireless magnetothermal deep brain stimulation. *Science* 2015;347(6229):1477-1480.
  15. Marinelli S, Pascucci T, Bernardi G, Puglisi-Allegra S, Mercuri NB. Activation of TRPV1 in the VTA excites dopaminergic neurons and increases chemical- and noxious-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology* 2005;30(5):864-870.
  16. Nam JH, Park ES, Won SY, Lee YA, Kim KI, Jeong JY, et al. TRPV1 on astrocytes rescues nigral dopamine neurons in Parkinson's disease via CNTF. *Brain* 2015;138(Pt 12):3610-3622.
  17. Starowicz K, Cristino L, Di Marzo V. TRPV1 receptors in the central nervous system: potential for previously unforeseen therapeutic applications. *Curr Pharm Des* 2008;14(1):42-54.
  18. Munshi R, Qadri SM, Zhang Q, Castellanos Rubio I, del Pino P, Pralle A. Magnetothermal genetic deep brain stimulation of motor behaviors in awake, freely moving mice. *eLife* 2017;6:e27069.
  19. Gunaydin LA, Grosenick L, Finkelstein JC, Kauvar IV, Fenno LE, Adhikari A, et al. Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell* 2014;157(7):1535-1551.
  20. Gooch CL, Pracht E, Borenstein AR. The burden of neurological disease in the United States: A summary report and call to action. *Ann Neurol* 2017;81(4):479-484.
  21. Scheife RT, Schumock GT, Burstein A, Gottwald MD, Luer MS. Impact of Parkinson's disease and its pharmacologic treatment on quality of life and economic outcomes. *Am J Health Syst Pharm* 2000;57(10):953-962.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Demonstration that selective excitation or inhibition of the STN causes rotatory behavior in wild-type mice
2	Demonstration that selective excitation or inhibition of the STN alleviates primary motor symptoms of PD.
3	Demonstration of magnetothermal activation of STN projection sites using fiber photometry in freely moving mice.

4	Pilot experiment: to evaluate the safety and distribution pattern of magnetoelectric nanoparticles
5	
6	
7	
8	
9	
10	

## **Aangepast DEC-advies inzake uitbreiding 02-01-2019/PV 2018-010-10.2 .e. en g /AVD1070020186046**

---

### **Preambule:**

De DEC-UM verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de DEC-UM.

### **A. Algemene gegevens over de procedure**

1. **Aanvraagnummer:** 10700
2. **Titel van het project:** *Wireless deep brain stimulation in Parkinson's Disease.*
3. **Titel van de NTS:** *Draadloze diepe hersenstimulatie bij de ziekte van Parkinson.*
4. **Type aanvraag:**
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. **Contactgegevens DEC:**
  - naam DEC; *DEC-UM*
  - telefoonnummer contactpersoon; 10.2 .e. en g
  - e-mailadres contactpersoon; [secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl](mailto:secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl)
6. **Adviestraject:**
  - ontvangen door DEC; 03-07-2018  
aanvraag compleet
  - in vergadering besproken; 06-07-2018  
anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van 11-07-2018 tot en met 21-09-2018 en van 26-09-2018 tot en met 03-10-2018.  
besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen  
aanpassing aanvraag  
advies aan CCD
7. **Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.**

*De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD. Zie ook de verklaring van de vertegenwoordiger van de vergunninghouder onder punt 6 ondertekening van de aanvraag.*
8. **Eventueel horen van aanvrager: N.V.T.**
9. **Correspondentie met de aanvrager:**
  - Datum; *11-07-2018 en 26-09-2018*
  - Gestelde vragen: *zie bijlage 1 en 2*
  - Datum antwoord: *21-09-2018 en 03-10-2018*
  - Verstreckte antwoorden: *zie bijlage 1 en 2*
  - De antwoorden hebben **wel** geleid tot aanpassing van de aanvraag

10. **Eventuele adviezen door experts: N.V.T.**

## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is. **JA**
2. De aanvraag betreft een **nieuwe aanvraag**.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **JA**
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. **N.V.T.**

## **C. Beoordeling (inhoud)**

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld).

*Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling, met name het onderzoeken of magnetothermale diepe-hersen-stimulatie (deep brain stimulation, DBS) superieur is aan klassieke DBS, en kan volgens de handreiking "invulling definitie project" het meest getypeerd worden als een project type 1. Het onderzoek wordt specifiek gericht op het onderzoeken van de mechanismen van magnetothermale STN (subthalamic nucleus) DBS in wild-type en Parkinson muis modellen. De aanvrager heeft tussen de doelstellingen criteria beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren. Een duidelijke strategie is beschreven met het belangrijkste go/no-go beslisstap indien er wel of geen gedragsverandering na magnetothermale STN DBS bij Parkinson muizen optreedt. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC-UM van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.*

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Flora- en faunawet).

*Voor zover de DEC-UM de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er geen aanleiding om deze strijdigheid met andere wettelijke bepalingen aanwezig te achten.*

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Neven doelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

*Het voorgelegde projectvoorstel heeft door het onderzoek naar mechanismen voornamelijk kenmerken van fundamenteel onderzoek.*

### **Belangen en waarden**

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe

en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

*Het uiteindelijke doel van deze voornamelijk fundamentele projectaanvraag is het onderzoeken of magnetothermale STN DBS een superieur alternatief vormt voor klassieke DBS in de context van Parkinson. De belangrijkste negatieve aspecten van klassieke DBS zijn het gebrek aan een draadloos systeem en het verhoogd voorkomen van gedragsveranderingen zoals depressie en zelfmoordneigingen bij klassieke DBS. Voorliggend onderzoek zal nagaan of magnetothermale STN DBS een waardevol alternatief is. Vooronderzoek in Amerika heeft aangetoond dat dit mogelijk is zo is.*

*Specifiek wordt binnen dit onderzoek gekeken naar volgende directe doelstellingen: 1) leidt magnetothermale STN DBS (activatie via channelrhodopsin en inhibitie via halorhodopsin bevattende virale constructen) via een optogenetica experiment tot veranderd rotatiegedrag in wild-type muizen; 2) leidt een vergelijkbare opzet tot het verlichten van de motorische symptomen bij een Parkinson (MPTP neurotoxine geïnduceerd) muismodel en 3) wat zijn de onderliggende mechanismen van magnetothermale STN DBS.*

*De specifieke directe doelstellingen, indien een positieve uitkomst, dragen bij tot het uiteindelijke doel van deze onderzoeksaanvraag. De directe doelen lijken haalbaar te zijn binnen het omschreven tijdsbestek op basis van de expertise van de onderzoekers en op basis van het vooronderzoek gedaan in Amerika, dewelke de onderzoeker heeft overgebracht naar Nederland. Het directe doel zal een bijdrage leveren aan het beter begrijpen van DBS, maar ook aan het verbeteren van DBS waardoor een best mogelijke reactie op Parkinson symptomen mogelijk kan worden. Het onderzoek heeft voornamelijk een fundamenteel karakter, waarbij gevonden onderzoeksresultaten binnen afzienbare tijd bij de patiënt toegepast kunnen worden. De onderzoekers zijn experts binnen het onderzoeksveld, hebben ruime ervaring met deze diermodellen en bijhorende gedragstesten. Deze expertise zal zeker bijdragen tot een succesvolle uitvoering van de voorgestelde experimenten.*

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld)

*Belanghebbenden binnen dit projectvoorstel zijn de dieren, onderzoekers en de wetenschap en de patiënten.*

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn:

*De integriteit van de dieren zal aangetast worden doordat in deze dieren virus in de hersenen wordt geïnjecteerd, een optische vezel in de hersenen wordt geïmplanteerd en het dier verschillende gedragstesten ondergaat. Voor een deel van deze dieren wordt Parkinson geïnduceerd door toediening van MPTP. Gedragstesten zijn gebaseerd op het bepalen van gemoed, cognitie en motorische functies en brengen een variërend ongerief naar de mening van de DEC-UM cumulerend in ernstig met zich mee. De dieren worden opgeofferd aan het eind van de proef.*

Waarden die voor patiënten en hun naasten bevorderd worden:

*Mechanistisch inzicht in magnetothermale DBS kan leiden tot een verbetering van DBS zodanig dat voor Parkinsonpatiënten hun symptomen op een adequate manier verlicht kunnen worden.*

Waarden die voor de onderzoekers en de medische wetenschap bevorderd worden:

*Onderzoekers binnen het veld van de neurowetenschappen, materiaalwetenschappen en biomedisch ingenieurs alsmede de medische wetenschap zullen biologische en technologische kennis verkrijgen over de effectiviteit en werkingsmechanismen van magnetothermale STN DBS.*

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wet- en regelgeving op het gebied van het omgaan met voor het milieu risicovolle stoffen of organismen.

*Voor zover de DEC-UM de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.*

### **Proefopzet en haalbaarheid**

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5).

*Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's. De aanvrager heeft verschillende (>15, Pubmed search) publicaties in context van DBS, heeft de techniek van magnetothermale DBS aangeleerd in Amerika en werkt binnen een afdeling met zeer uitgebreide ervaring binnen het veld van Parkinson onderzoek en gedragstesten. Op basis hiervan gaat de DEC-UM ervan uit dat er voldoende ervaring en expertise aanwezig is om dit project succesvol uit te kunnen voeren.*

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6).

*De DEC-UM is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC-UM leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project. Het onderzoek bouwt verder op onderzoeksresultaten van de aanvrager behaald in Amerika (10.2 e. en g) waarbij werd aangetoond dat magnetothermale DBS leidt tot gedragsveranderingen in wild-type muizen. Daarnaast is er recent aangetoond dat STN DBS motorische symptomen in Parkinson ratten kan verlichten via serotonine en dopamine neurotransmissie (Kocabicak et al 2015). De primaire uitleesparameter is een veranderd gedrag, te meten met verschillende gedragstesten, na magnetothermale activerende of inhiberende DBS. Er wordt gekozen voor een wild-type model (doelstelling 1) en een Parkinson diermodel (doelstelling 2 en 3), waarbij een duidelijk go/no-go beslissing gehanteerd wordt vooraleer de onderliggende mechanismen (doelstelling 3) te onderzoeken.*

### **Welzijn dieren**

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden). **N.V.T.**

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

*De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is op basis van de daartoe strekkende verklaring (in duplo) van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder, als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 der ondertekening van de aanvraag en punt F in de bijlagen. Alle dieren worden sociaal gehuisvest, tenzij bij vechten, waarbij dieren individueel zullen worden gehuisvest zodat de gedragsuitleesparameter niet beïnvloed wordt (alle dieren ondergaan dezelfde behandeling). De onderzoekers hebben voldoende onderbouwd waarom dit noodzakelijk en belangrijk is, aangezien de onderzoeksresultaten negatief beïnvloed worden.*

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2).

*De DEC-UM acht het ongerief realistisch ingeschat. Het ongerief bij de verschillende procedures is duidelijk omschreven en varieert van mild tot ernstig, echter het cumulatief ongerief wordt voor alle dieren (100%) door de DEC-UM als ernstig beschouwd door de veelheid van experimentele procedures. Verschillende operaties, gecombineerd met verschillende gedragstesten onderschrijven deze cumulatieve ongeriefindicatie.*

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2). (zie bijlage I voor voorbeeld).

*De integriteit van de dieren zal aangetast worden doordat in deze dieren via een hersenoperatie (of meerdere hersenoperaties) virus wordt geïnjecteerd, een optische vezel wordt geïmplanteerd, DBS wordt uitgevoerd. Voor een deel van deze dieren wordt Parkinson geïnduceerd door toediening van MPTP. Na een herstelperiode worden de dieren blootgesteld aan verschillende gedragstesten die gebaseerd zijn op het bepalen van gemoed, cognitie, geheugen, angst en motorische functies dewelke een variërend ongerief (mild tot ernstig) cumulerend in ernstig met zich meebrengen. De dieren worden opgeofferd aan het eind van de proef.*

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).

*Naar de mening van de DEC-UM zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag. Deze zijn gebaseerd op het voorkomen van ongewoon gedrag op basis van klinische parameters zoals houding, mobiliteit, facial expression, body composition, ademhaling, huid. Een score systeem wordt geïmplementeerd dewelke afwijking van welzijn bijhoudt. Er wordt verwacht dat minder dan 10% van de dieren kans loopt op het bereiken van een humaan eindpunt. Meer complicaties worden verwacht bij muizen met Parkinson symptomen in vergelijking met wild-type muizen op basis van veranderde voedingsinname en lichaamsgewicht.*

### 3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

*De DEC-UM is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met de aangevraagde dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel. Computermodellen en in vitro systemen zijn niet voorhanden of onvoldoende geschikt om gedrag te meten. Door het gebruik van virale vectoren is dit onderzoek rechtstreeks in mensen ook niet mogelijk. Deze argumenten zijn duidelijk omschreven in de verschillende appendices horende bij deze aanvraag.*

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

*Naar de mening van de DEC-UM is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat zulks mede gebaseerd op statistische analyse middels een poweranalyse (one-way ANOVA). Deze poweranalyse is gebaseerd op historische data vanuit publicaties en vanuit de eigen onderzoeksgroep. Er wordt een gefaseerde onderzoeksstrategie gehanteerd om de verschillende hypothesen te testen om onnodige en extra experimenten te vermijden. Het is echter niet duidelijk hoe de aanvrager tot een aantal van 25 dieren per experimentele groep komt. De DEC-UM is van mening dat hiervoor onvoldoende onderbouwing is gegeven en dat een kleinere groepsgrootte ook tot significante resultaten kan leiden. Bovendien is de noodzaak van het gebruik van een controlegroep (fysiologische oplossing) voor de inductie van Parkinson niet duidelijk beschreven. Parkinson wordt geïnduceerd door intraperitoneale MPTP-injectie, waarbij de onderzoekers de noodzaak van een controlegroep onderbouwen door het voorkomen van een beperkte mate van stress door deze injectie. Er wordt een duidelijke strategie met go/no-go beslismomenten gehanteerd, waarbij eerst getest wordt of magnetothermale DBS een effect heeft in Parkinson muizen vooraleer men de onderliggende mechanismen gaat onderzoeken.*

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

*De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen zonder dat dit het behalen van de doelstelling in de weg staat. Hierbij heeft de DEC-UM onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken. Dieren zullen adequate pijnverlichting krijgen bij de operaties en individuele huisvesting wordt beperkt tot wat nodig is binnen de experimentele opzet.*

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe.



*Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.*

### **Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef**

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*; zie *bijlage I* voor voorbeeld).

*De aanvrager zal in het project gebruik maken van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren. Voor doelstelling 1 wordt er gebruik gemaakt van mannelijke dieren, voor doelstelling 2 en 3 worden beide geslachten gebruikt. De DEC-UM is van mening dat de aanvrager het gebruik van beide geslachten voldoende wetenschappelijk heeft onderbouwd en dat het om de doelstellingen te bereiken noodzakelijk is om de proeven met dergelijke dieren uit te voeren. De onderzoekers verwachten een invloed van de hormonale cyclus op gedrag en neurochemie en verdubbelen het aantal dieren om hun onderzoek zowel in mannelijke als vrouwelijke dieren uit te voeren.*

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

*Naar de mening van de DEC-UM is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager, want de dieren worden gedood in het kader van de proef. Hersenen worden geïsoleerd voor histologische analyses om na te gaan of de elektrode correct werd aangebracht en om neuro-anatomische effecten van DBS te controleren en te relateren aan veranderd gedrag.*

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. **N.V.T.**

### **NTS**

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

*Naar de mening van de DEC-UM is zulks het geval.*

## **D. Ethische afweging**

1. Benoem de centrale morele vraag (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).

*Rechtvaardigt het onderzoek de opoffering (volgens de directive 2010/63/EU) en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project: Wireless deep brain stimulation in Parkinson's Disease?*

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden*).

- Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: *ernstig nadeel*
- Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: *reëel*
- Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: *substantieel*
- Waarden die voor industrie bevorderd worden: *gering*
- Waarden die voor de medische wetenschap bevorderd worden: *substantieel*
- Waarden die voor de maatschappij als geheel bevorderd worden: *reëel*
- Welk belang moet de DEC-UM hechten aan dit PV? *Substantieel*

*De DEC-UM is van mening dat de belangen van de onderzoekers, de medische wetenschap en de samenleving in het algemeen binnen het project "Wireless deep brain stimulation in Parkinson's Disease" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot de dood na ernstig ongerief. De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal aangetast worden doordat in deze dieren via een hersenoperatie (of meerdere hersenoperaties) virus wordt geïnjecteerd, een optische vezel wordt geïmplant, DBS wordt uitgevoerd. Voor een deel van deze dieren wordt Parkinson geïnduceerd door toediening van MPTP. Na een herstelperiode worden de dieren blootgesteld aan verschillende gedragstesten die gebaseerd zijn op het bepalen van gemoed, cognitie, geheugen, angst en motorische functies dewelke een variërend ongerief (mild tot ernstig) naar de mening van de DEC-UM culmulerend in ernstig met zich meebrengen. De dieren worden opgeofferd aan het eind van de proef. Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project er echter bijdragen aan een verbeterd mechanistisch inzicht in magnetothermale DBS en aan mogelijks een therapeutisch voordeel voor patiënten met Parkinson, waarbij er op de best mogelijke manier op de symptomen van Parkinson wordt gereageerd. Wetenschappelijk gezien heeft dit project een substantieel belang. De onderzoeksgroep heeft reeds aangetoond dat magnetothermale DBS leidt tot gedragsveranderingen in wild-type muizen (vooronderzoek in Amerika, dewelke geïmplementeerd wordt in Nederland). Tevens heeft de onderzoeksgroep ruime ervaring met DBS in ratten en verschillende gedragstesten om effecten van DBS op gedrag te onderzoeken. De expertise wordt gebruikt om 1) te onderzoeken of magnetothermale DBS (activatie ofwel inhibitie) leidt tot veranderingen in rotatiegedrag; 2) te onderzoeken of magnetothermale DBS Parkinson symptoom verlichtend kan werken en 3) wat de onderliggende biologische mechanismen hiervan zijn.*

*Op grond van al deze argumenten acht de DEC-UM het onderhavige onderzoek van substantieel belang. De DEC-UM acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren aanvaardbaar blijft in relatie tot het te behalen voordeel.*

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2).

Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel.

*De DEC-UM acht de centrale morele vraag: "Rechtvaardigt het onderzoek de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project: "Wireless deep brain stimulation in Parkinson's Disease?" als positief beantwoord. Hoewel de DEC-UM de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren, weegt het substantiële belang van dit project naar haar mening zwaarder.*

*Dit projectvoorstel omvat fundamenteel onderzoek die mogelijks kan leiden tot een verbeterd mechanistisch inzicht in magnetothermale DBS en tot in de toekomst mogelijks een therapeutisch voordeel voor patiënten met Parkinson, waarbij er op de best mogelijke manier op de symptomen van Parkinson wordt gereageerd. Momenteel zijn er enkel behandelingen beschikbaar voor Parkinsonpatiënten die inwerken op de symptomen van de ziekte. Deze zijn veelal farmacologisch van aard en zijn vaak geassocieerd met motorische complicaties. DBS kan in dit geval verlichting geven en klassieke DBS van de subthalamische kern (STN) is de meest uitgevoerde procedure. Voornaamste nadelen van deze procedure is het gebrek aan een draadloos systeem en het ontstaan van gemoedsveranderingen zoals depressie en zelfmoordneigingen. Het voorgestelde onderzoek, indien succesvol, biedt een mogelijk antwoord voor deze gebreken en zorgt ervoor dat patiënten opnieuw (of langer) een betere levenskwaliteit en beter sociaal geïntegreerd kunnen worden. De aanvrager heeft duidelijk ervaring binnen het DBS onderzoeksveld, wat blijkt uit de publicatielijst (bron: Pubmed) en het overgebrachte onderzoek uit Amerika. Bovendien is het onderzoek van de aanvrager ingebed binnen een afdeling met heel veel expertise in gedragsonderzoek. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC-UM leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.*

*De onderzoekers hebben nagedacht om het aantal gebruikte dieren tot een minimum te beperken met een duidelijke poweranalyse gebaseerd op basis van historische data. De DEC-UM blijft echter met vragen zitten over het ogenschijnlijk onnodig gebruik van controlegroepen voor het Parkinson ziektemodel, over het verdubbelen van het aantal dieren om hormonale effecten uit te sluiten bij vrouwelijke dieren en de groepsgrootte voorgesteld voor de experimenten die excessief lijkt te zijn. Uitgebreide ervaring met dit type gedragstesten heeft door de jaren heen geleid tot een duidelijke verfijning van deze testen zodat het hiermee gepaarde ongerief zo beperkt mogelijk blijft. Het ongerief van de verschillende procedures binnen dit project zijn duidelijk omschreven. Het cumulatieve ongerief is door combinatie van verschillende operaties en bepaalde gedragstesten ingeschat op 100% ernstig.*

*Voor zover de DEC-UM de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er geen aanleiding om deze strijdigheid met andere wettelijke bepalingen aanwezig te achten. Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-UM de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Wireless deep brain stimulation in Parkinson's Disease?" als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de DEC-UM het projectvoorstel van een positief advies.*

## E. Advies

1. Advies aan de CCD:

**X** De DEC-UM adviseert de vergunning te verlenen.

- *Overige door de DEC-UM aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten dat de CCD in de vergunning de verplichting tot beoordeling achteraf dient op te nemen gezien de wettelijke eis daartoe in geval van ernstig ongerief.*

2. Het uitgebrachte advies is **unaniem** tot stand gekomen.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

*Als knelpunten moeten worden genoemd het ogenschijnlijk onnodig gebruik van controlegroepen voor het Parkinson ziektemodel, het verdubbelen van het aantal dieren om hormonale effecten uit te sluiten bij vrouwelijke dieren en de groeps grootte voorgesteld voor de experimenten die excessief lijkt te zijn. Deze knelpunten kunnen te zijner tijd bij het ontwerpen van werkprotocollen door de Instantie voor Dierenwelzijn nader worden beschouwd.*

### **Advies DEC-UM inzake uitbreiding 02-01-2019:**

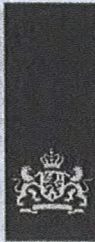
De onderzoekers vragen een wijziging van het onderzoeksvoorstel getiteld "Wireless deep brain stimulation in Parkinson's Disease" gepaard gaande met een uitbreiding van 88 dieren. Er wordt geen verandering in het reeds beschreven ongerief verwacht voor appendices 2 tot en met 3 (wat ingeschat blijft op ernstig), het verwachte ongerief voor de uitbreiding omschreven in appendix 4 wordt ingeschat op matig.

Op basis van voortschrijdend onderzoek vanuit het Max Planck instituut, Duitsland, willen de onderzoekers neuromodulatie m.b.v. magnetothermal nanoparticles (MNPs) en virale ANO1 introductie vervangen door magnetoelectric nanoparticles (MENs). In vitro experimenten hebben aangetoond dat deze MENs de elektrische activiteit van neuronale cellen kan moduleren waarbij een breder gamma aan stimulatie parameters kan toegepast worden om gedrag na neuromodulatie te optimaliseren. Deze wijziging gaat gepaard met een verfijning van de experimentele opzet, aangezien er één hersenoperatie minder dient uitgevoerd te worden. Dit is geldig voor appendices 2 en 3, hetgeen enkel leidt tot redactionele veranderingen in deze beide bijlagen.

Echter, hoewel in vitro therapeutische effectiviteit is aangetoond, is het niet bekend in welke mate MENs doordringen in hersenweefsel, hoe deze verdeeld en geïntegreerd worden in de hersenen en ondanks dat er geen toxiciteit verwacht wordt, is de in vivo veiligheid van deze MENs ook niet bekend. Hiervoor wordt een extra appendix (nr. 4) toegevoegd om deze effecten in een pilot te kunnen onderzoeken, waarbij 88 extra dieren worden aangevraagd. Er is een duidelijk go/no-go beslisstap ingebouwd indien er geen in vivo effectiviteit wordt ervaren en indien deze MENs niet veilig worden bevonden. Het totale ongerief voor de uitbreiding is matig.

14 juli 2016

De DEC-UM stemt in met de wijziging. De onderzoekers zorgen met de wijziging voor een verfijning van het onderzoek (1 operatie minder nodig bij appendices 2 en 3) ten opzichte van de initiële aanvraag. De DEC-UM acht de uitbreiding noodzakelijk om in vivo effectiviteit en veiligheid van MENSs eerst aan te tonen. De onderzoekers hanteren hierbij een duidelijk go/no-go beslismoment. Derhalve voorziet de DEC-UM deze uitbreiding unaniem van een positief advies. Naar verklaring van de aanvrager zijn deze wijzigingen ook doorgevoerd in de NTS.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Universiteit Maastricht

10.2.e. en g

Postbus 616  
6200 MD MAASTRICHT

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD1070020186046-1

Datum 9 april 2019

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 14 februari 2019 hebben wij uw aanvraag voor wijziging van een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Draadloze diepe hersenstimulatie bij de ziekte van Parkinson" met aanvraagnummer AVD1070020186046, waarvoor op 21 november 2018 een vergunning is afgegeven. Uw wijzigingsaanvraag is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer AVD1070020186046-1. Met de aangevraagde wijziging van de eerder verleende vergunning beoogt u nieuwe dierproeven toe te voegen aan de vergunning. Wij hebben uw wijzigingsaanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij wijzen uw wijzigingsaanvraag toe. Dit betekent dat het op grond van artikel 10a, lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) is toegestaan de in de wijzigingsaanvraag beschreven dierproeven onder de vergunning voor het project "Draadloze diepe hersenstimulatie bij de ziekte van Parkinson" met aanvraagnummer AVD1070020186046 uit te voeren. Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen wij tot deze beslissing zijn gekomen.

### **Procedure**

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC-UM (hierna: de DEC). Dit advies is opgesteld op 18 maart 2019. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC. Wij nemen dit advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

### **Overwegingen**

Op grond van de bovenstaande stukken zijn wij van mening dat de toe voegen dierproeven toelaatbare wijzigingen betreffen van het project, waarvoor op 21 november 2018 een vergunning is verleend. Om onderstaande redenen zijn wij tot dit oordeel gekomen.

### **Vergunning**

Aan de vergunning worden de volgende dierproeven toegevoegd:

**Datum**  
8 april 2019

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD1070020186046-1

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Bijlage dierproeven 3.4.4.4 Pilot experiment: to evaluate the safety and distribution pattern of magnetoelectric nanoparticles	muizen	88	100% matig

Verder is het toegestaan dat magnetoelectric nanoparticles (MENS) wordt toegevoegd aan bijlagen 3.4.4.2 en 3.4.4.3.

Voor het overige blijft de vergunning ongewijzigd.

U dient deze brief toe te voegen bij uw oorspronkelijke vergunning.

#### **Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC, Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze gegevens in het colofon.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

#### **Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

10.2 .e. en g  
Drs. F. Braumstahl

#### **Bijlagen**

- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



## Format

### Projectvoorstel dierproeven

1. Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
2. Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 10800
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. Universiteit Utrecht
- 1.3 Vul de titel van het project in. Onderzoek naar interacties tussen darmmicrobiota en de ontwikkeling van het afweersysteem bij vleeskuikens

### 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

1. Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
2. Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).



3. Geef in geval van 'hogere onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

#### Achtergrond van het overkoepelende onderzoeksproject

Duurzaamheid, dierenwelzijn en diergezondheid zijn in toenemende mate belangrijk voor een toekomstgerichte en maatschappelijk acceptabele vleeskuikenhouderij. Terwijl in het verleden vooral nadruk lag op het verhogen van de productieresultaten is inmiddels duidelijk dat dit veel negatieve effecten geeft. Het fokken op snelle groei is ten koste gegaan van de weerstand van de dieren (Van der Most et al. 2011 *Funct Ecol* 25:74–80) en er zijn veel gezondheids- en welzijnsproblemen door ontstaan (De Jong et al. 2012 *EFSA* 9(6):EN-295. doi:10.2903/sp.efsa.2012.EN-295). Daarnaast is in Nederland sinds 2010 een EU-welzijnsrichtlijn voor vleeskuikens (Council Directive 2007/43/EC) geïmplementeerd. Er worden extra eisen gesteld aan vleeskuikenmanagement, maximale sterftepercentages en voetzollaesies wanneer de veehouder voor een hoge bezettingsgraad kiest, omdat wordt aangenomen dat bij een hoge bezettingsgraad dierenwelzijn en diergezondheid meer onder druk kunnen komen te staan. Hierbij moet opgemerkt worden dat goed management een meer zwaarwegende factor is dan de bezettingsgraad op zich (Dawkins et al. 2004 *Nature* 427 (6972): 342-344). Ook is er tegenwoordig veel oog voor de nadelige effecten op mens en dier van het toepassen van antimicrobiële middelen bij voedselproducerende dieren. Waar voorheen het preventief toepassen van groeibevorderaars (lage doses antibiotica aan het voer), en na het EU-verbod hierop in 2006 het frequent toepassen van curatieve antimicrobiële behandelingen, primair werden ingezet om productieprestaties te verbeteren en dierziekten te bestrijden, is tegenwoordig de focus verlegd naar het op meer duurzame wijze zorgen voor gezonde en goed producerende landbouwhuisdieren.

In het kader van deze ontwikkelingen wordt vanuit overheden en de pluimvee-industrie gestimuleerd dat diverse schakels in de pluimvee-industrie vooral streven naar 'gezonde, robuuste' dieren met het doel kwalitatief hoogstaande vleesproducten te produceren. Hieraan is gekoppeld dat de focus van onderzoek binnen R&D afdelingen en wetenschappelijke instellingen is verschoven naar genetische selectie, productiesystemen en diervoeders die de gezondheid en weerstand bevorderen. Het Topsectorenbeleid (in dit geval de Topsector Agri&Food) van de overheid subsidieert initiatieven van onderzoeksconsortia van industrie en wetenschappelijke instellingen, om met goede oplossingen te komen voor belangrijke maatschappelijke en economische uitdagingen. Deze studie maakt dan ook onderdeel uit van een door NWO en een grote voerfabrikant gesubsidieerd onderzoeksproject, waarin het onderzoek naar het bewerkstelligen van een gunstige samenstelling van darmmicrobiota centraal staat. Als onderdeel van een heel palet aan manieren om vleeskuikens op meer duurzame wijze gezonder te houden, waarvoor de inzet van verschillende disciplines binnen de pluimvee-industrie nodig is, willen wij ons met dit overkoepelende project specifiek richten op het bevorderen van de (darm)gezondheid van vleeskuikens door middel van de voeding.

Onder andere vanuit humaan onderzoek, waaronder het NIH Common Fund Human Microbiome Project (<https://hmpdacc.org/>), is duidelijk geworden hoe belangrijk bacteriën in de darm kunnen zijn voor de algehele gezondheid, maar ook dat nog veel onduidelijk is over de functie, biologie/fysiologie en dynamiek van de interacties tussen de gastheer en darmmicrobiota. Inmiddels hebben diverse onderzoeksgroepen zich ook gericht op het bestuderen van de darmmicrobiota in vleeskuikens. Ook voor vleeskuikens geldt dat darmkolonisatie met microbiota (vooral darmbacteriën), direct na uitkomst uit het ei, bepalend is voor veel essentiële levensprocessen van vleeskuikens. De samenstelling en diversiteit van het darmmicrobioom (=de verzameling darmmicrobiota), beïnvloedt de ontwikkeling van het immuunsysteem en efficiëntie in voerbenutting voor ontwikkeling en groei in vleeskuikens (Kohl et al., 2012: *J Comp Physiol B* 182(5):591-602). De samenstelling van de darmmicrobiota wordt bepaald door vele interacties tussen gastheer en omgevingsfactoren en varieert binnen en tussen koppels vleeskuikens (Wei et al., 2013: *Poult Sci* 92(3):671-83). Deze variatie is geassocieerd met verschillen in productieprestaties en kunnen worden beïnvloed door aanpassingen in het voer (Stanley et al., 2012: *Appl Microbiol Biotechnol* 96(5):1361-9). Verstoringen van de microbiota samenstelling gaan meestal gepaard met veranderingen in de regulatie van het immuunsysteem, hierdoor verandert het

immunologische evenwicht in de darm en dit vergroot de gevoeligheid op infecties met bepaalde pathogenen (Smits et al., 2014: Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 23). Hoewel uit dergelijk onderzoek duidelijk is geworden dat voeding, darmmicrobiota en het immuunsysteem elkaar beïnvloeden, ook bij vleeskuikens, zijn de mechanismen nog grotendeels onduidelijk, en willen we in deze studie delen hiervan ontrafelen. Ons uiteindelijke doel is om door middel van gerichte aanpassingen aan het voer te bewerkstelligen dat we vleeskuikens gezonder kunnen houden. Gezondere koppels vleeskuikens hebben veel voordelen voor de dieren zelf, maar ook voor de consument van pluimveevlees. In een gezond koppel kippen zal het sterftepercentage lager zijn en zal het welzijn van de dieren beter zijn. Daarnaast zal een goede weerstand de kans op oplopen van infecties die bij de mens tot voedselinfecties kunnen leiden (zoals *Salmonella* en *Campylobacter*) verminderen. Ook zullen kippen die gezond zijn minder snel worden behandeld met antibiotica. Kortom, gezondere koppels pluimvee zorgen voor minder kans op overdracht van dierziekten of antibioticaresistentie van dier naar de mens via de consumptie van vlees. Tevens dient het bevorderen van de darmgezondheid van vleeskuikens de duurzaamheid nog op andere wijze. Een gezonde vleeskuikendarm zal op efficiëntere wijze het diervoeder kunnen omzetten in vlees. Dit zorgt voor een lagere koolstofvoetafdruk van het vlees en een relatief lagere mestproductie, wat tevens ten goede komt aan grond-, oppervlaktewater- en luchtkwaliteit rondom het pluimveebedrijf.

Binnen dit overkoepelende onderzoeksproject zullen wij in experimenten met vleeskuikens gaan toetsen hoe, door middel van voerinterventies, de darmmicrobiota en het immuunsysteem gunstig beïnvloed kunnen worden. Hierbij wordt vooral gekeken naar de aangeboren (innate) afweer, aangezien vleeskuikens met hun zeer korte levensduur een groot deel van hun leven voornamelijk hiervan afhankelijk zijn. Daarnaast zullen we in een ~~proof-of-principle~~ vervolg experiment onderzoeken of het beïnvloeden van de samenstelling van de darmmicrobiota en het aangeboren afweersysteem door voerinterventies leidt tot gezondere kuikens die beter bestand zijn tegen infecties met ziekteverwekkers zoals de bacterie *S. enteritidis*.

Het door NWO gefinancierde onderzoek is opgebouwd uit verschillende pijlers, waarvoor al diverse projectvergunningen zijn verleend en waarop deze projectaanvraag voortbouwt.

#### Achtergrond van de interactieproeven van deze vergunningsaanvraag

Deze projectaanvraag betreft proeven waarmee interacties tussen voeding, darmmicrobiota en het afweersysteem worden onderzocht (naar deze proeven wordt gerefereerd als 'interactieproeven'). Diverse stukjes van deze puzzel zijn al bekend uit de literatuur:

- Door middel van blootstelling van kuikens kort na uitkomst aan voedingsstoffen en microbiota kan de ontwikkeling van het immuunsysteem worden beïnvloed (Cunningham-Rundles et al. 2005: J Allergy Clin Immunol 115: 1119-28, quiz 1129; Green et al. 2014 Clin Exp Immunol 136: 472-82; Bar-Shira et al. 2006 Dev Comp Immunol 30: 930-41; Yin et al. 2010 ISME Journal 4:367-76; Bar-Shira et al. 2003 Dev Comp Immunol 27: 147-57; Torok et al. 2011 Appl Environ Microbiol 77: 3380-90).
- Andersom heeft het (innate) immuunsysteem invloed op welke typen bacteriën de darm kunnen koloniseren evenals in de mate waarin kolonisatie kan plaatsvinden (Bar-Shira et al. 2006 Dev Comp Immunol 30: 930-941; Crhanova et al. 2011 Inf Imm 79: 2755-63). In deze studies is naar expressie van genen die te maken hebben met het innate immuunsysteem gekeken in weefsels gekeken. Wij gaan kijken naar de aanwezigheid en functie van specifieke cellen.
- Daarnaast weten we dat de samenstelling van darmmicrobiota (gemakshalve naar gerefereerd als darmmicrobiota profielen) sterk varieert binnen en tussen koppels vleeskuikens en dat dit verband lijkt te houden met verschillen in productiestatistieken en kan worden beïnvloed door voeraanpassingen (Apajalahti et al. 2001: Appl Environ Microbiol 67:5656-67; Stanley et al. 2013: Vet Microbiol 164: 85-92).
- Ook zijn er bepaalde voedingscomponenten die een immuunmodulerende werking hebben en direct invloed kunnen uitoefenen op het (innate) immuunsysteem (Alizadeh et al. 2016 Av Path 45: 334-45; Wiaętkiewicz et al 2014 World's Poult Sc J 70: 57-68).

Ter illustratie: een voorbeeld van componenten die aan het voer kunnen worden toegevoegd zijn bv. polysacchariden uit o.a. paddestoelen, waaraan immuno-actieve, productiebevorderende en

darmmicrobiota beïnvloedende eigenschappen zijn toegeschreven. In een artikel van Guo et al (2003 World's Poult Sc J 59: 427-40) worden polysacchariden beschreven die aantallen en activiteit van het innate en adaptieve immuunsysteem kunnen beïnvloeden en de darmmicrobiota samenstelling en fermentatieprocessen in de darm beïnvloeden.

Kortom, vanuit de literatuur en vanuit de kennis en ervaring bij de leden van ons consortium zijn er genoeg aanwijzingen dat het kansrijk kan zijn om door middel van aanpassingen in de voeding invloed uit te oefenen op de darmmicrobiota en het immuunsysteem om gezonde en goed presterende vleeskuikenkoppels te krijgen.

Onduidelijk is echter nog welke darmmicrobiota profielen gunstig zijn voor de ontwikkeling van het immuunsysteem (en gepaard gaan met nog voldoende efficiënte productieprestaties<sup>#</sup>), en hoe we deze profielen bij vleeskuikens kunnen genereren via voeding. Naast het beantwoorden van deze toepassingsgerichte vraag, is het tevens belangrijk meer inzicht te krijgen in meer fundamentele processen. We vragen ons bijvoorbeeld af in hoeverre bepaalde voedingscomponenten rechtstreeks invloed hebben op het immuunsysteem of dat dit vooral via het beïnvloeden van de darmmicrobiota gaat en in hoeverre het immuunsysteem invloed kan uitoefenen op de samenstelling van de darmmicrobiota.

*# Bekend is ook dat een zeer sterke respons van het immuunsysteem veel van dieren kan vergen en dat een zekere mate van tolerantie van het immuunsysteem soms gunstiger kan uitpakken (zowel vanuit oogpunt van dierwelzijn/gezondheid als in het kader van efficiënte groei), zoals o.a. beschreven door Rauw 2012 Front Genet 3:267.*

Voordat het mogelijk is om experimenten om interacties tussen voeding, het afweersysteem en darmmicrobiota te onderzoeken goed te kunnen opzetten en uitkomsten te kunnen interpreteren was het noodzakelijk om eerst *in vivo* (veld- en experimentele studies) en *in vitro* werk te verrichten. Belangrijke vragen die beantwoord moesten worden (en momenteel in onderzoek zijn) zijn (zie tevens een nadere uitleg hiervan bij 3.4 en de figuur in de bijlage voor een visuele weergave):

A) Hoe zien darmmicrobiota profielen van vleeskuikens eruit en hoe zijn deze het beste te karakteriseren? (AVD108002016442: *Veldstudie voor ontwikkeling van een methode om darmmicrobiota in vleeskuikenkoppels te karakteriseren en voor het bepalen van de variatie tussen en binnen koppels*). Hierbij worden verschillende typen monsters op verschillende tijdstippen bij verschillende koppels worden verzameld en geanalyseerd.

B) Hoe ziet de normale opbouw van de aangeboren (innate) afweer bij vleeskuikens eruit? (AVD108002017863: *Het karakteriseren van de ontwikkeling van het innate immuunsysteem van vleeskuikens*). Hierbij ligt de nadruk op natural killer cellen (NK cellen) en dendritische cellen (DC), die niet alleen bepalend zijn voor de eerste aangeboren (innate) afweerreactie maar ook de adaptieve respons helpen op gang te brengen.

C) Een andere randvoorwaarde voor de interactieproeven is een goede opzet waarbij vrijwel uitsluitend het effect van de interventie kan worden getest, zonder versturende factoren. Hiertoe is een experiment bedacht waarbij de invloed van huisvesting op de uitkomsten van een voerproef wordt getest (AVD1080020171005: *Dynamiek van darmmicrobiota binnen en tussen hokken met vleeskuikens en de invloed ervan op uitkomsten van voedingsproeven*). Uit deze proef zal duidelijk worden of aan elkaar grenzende hokken, hokken met een kleine ruimte ertussen of isolatoren het beste zijn voor darmmicrobiota onderzoek. Wanneer er namelijk teveel uitwisseling van microbiota tussen groepen op kan treden, zullen behandelingseffecten moeilijker kunnen worden aangetoond. De type huisvesting die geschikt wordt gevonden zal gebruikt worden voor interactieproeven. In die proef worden tevens 2 voersamenstellingen vergeleken: afhankelijk van de effecten van deze voeders op darmmicrobiota kan deze proef mogelijk een kandidaat opleveren voor interactieproeven.

D) Verder wordt er *in vitro* getest met diverse voercomponenten om te onderzoeken wat de primaire effecten zijn van voercomponenten op NK cellen en Antigen Presenterende Cellen; twee belangrijke celtypen van het vroege afweersysteem (zie nadere toelichting bij 3.4.). In deze experimenten wordt gewerkt met embryonale cellen (NK) en een kippencellijn. Vanwege het gebruik van cellen uit kippenembryo's is dit geen dierproef.

E) Daarnaast voert onze consortiumpartner allerlei proeven en veldstudies uit, onder hun eigen vergunningen, om kansrijke voercomponenten te helpen identificeren.

Aan de hand van al deze data, die momenteel is / wordt verzameld, willen we de interactieproeven die worden beschreven in deze projectaanvraag gaan opzetten en uitvoeren om meer inzicht te krijgen in hoe voeding, darmmicrobiota en het afweersysteem elkaar kunnen beïnvloeden bij vleeskuikens.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

4. In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
5. In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

#### Doelstelling:

Binnen deze projectvergunning willen we in twee drie verschillende typen dierproeven de volgende doelstellingen realiseren:

1. *In vivo* onderzoeken of, en in welke mate, de ontwikkeling van de innate afweer anders is in groepen vleeskuikens met verschillende darmmicrobiota samenstellingen;
2. *In vivo* onderzoeken of en in welke mate bepaalde voercomponenten, die volgens eerder (*in vitro*\* of *in vivo*\*\*\*) onderzoek hebben aangetoond het immuunsysteem te kunnen beïnvloeden, invloed hebben op het (innate) immuunsysteem en de darmmicrobiota.
3. *In vivo* onderzoeken of bepaalde voercomponenten, die volgens eerder *in vivo*\*\*\* onderzoek invloed hebben op het (innate) immuunsysteem en de darmmicrobiota in staat zijn om vleeskuikens te beschermen tegen een infectie met *S. enteritidis*

\* Ten tijde van het schrijven van deze aanvraag worden ruim 15 voercomponenten, bekend uit de literatuur voor *in vitro* of *in vivo* effecten op met name het innate immuunsysteem, en nog eens 50 die door de consortiumpartner zijn aangedragen, *in vitro* getest op cellen van het innate immuunsysteem (natural killer cellen en antigeen presenterende cellen)

\*\* Onder andere de uitkomsten van dierproef 1 van deze aanvraag, lopend onderzoek van onze consortiumpartner en gepubliceerd onderzoek.

\*\*\* Onder andere de uitkomsten van dierproef 2 van deze aanvraag en lopend onderzoek van onze consortiumpartner.

Deze 2 3 typen dierproeven hebben als hoofddoel om:

- a) Inzicht te krijgen in de mate waarin de ontwikkeling in de samenstelling van darmmicrobiota invloed heeft op de ontwikkeling van het immuunsysteem (proef 1);
- b) Toepassingsgerichte informatie te verzamelen over welke voercomponenten invloed kunnen uitoefenen op het immuunsysteem, op darmmicrobiota of beiden, hoe groot deze effecten zijn en welke mechanismen hierbij betrokken zijn (proef 2).

Daarnaast hebben we belangrijke vragen die lastiger te beantwoorden zijn, maar waar we met de combinatie van deze proeven (en met name proef 2) meer inzicht in hopen te krijgen. We vragen ons bijvoorbeeld af of de voeding rechtstreeks invloed heeft op het immuunsysteem (een primair effect) of dat dit vooral een secundair effect en met name via het beïnvloeden van de darmmicrobiota gaat (proef 2) Ook hopen we meer inzicht te krijgen of en hoe het immuunsysteem een rol speelt in de microbiota samenstelling van de darm.

c) Toepassingsgerichte informatie te verzamelen over welke voercomponenten invloed kunnen uitoefenen op bescherming tegen een infectie met een ziekteverwekker zoals *S. enteritidis* door middel van een effect op het immuunsysteem, op darmmicrobiota of beiden (proef 3).

#### Haalbaarheid:

Het project wordt uitgevoerd door een consortium van partijen met de benodigde expertise en infrastructuur om de doelen te bereiken.

- De haalbaarheid van het overkoepelende onderzoeksproject is door een externe subsidiegever getoetst, namelijk NWO. Zij beoordeelden het consortium als sterk en waren ervan overtuigd dat de beoogde doelen haalbaar waren en hebben daarom een omvangrijke subsidie toegekend.
- Voor het uitvoeren van de dierproeven is de benodigde infrastructuur ten aanzien van dierfaciliteiten en laboratoriumfaciliteiten uitgebreid voorhanden. Deze faciliteiten zijn veelvuldig succesvol ingezet in voorgaande experimenten met vleeskuikens.
- De microbiota analyses worden uitgevoerd in samenwerking met een van de consortium partners waar al de kennis en expertise in huis is. Ook zijn een statisticus en een wiskundig modelleur betrokken bij de opzet en het analyseren van voorgaande proeven en deze proef.
- Binnen het consortium is bij de start van deze proeven veel unieke informatie beschikbaar uit eerdere proeven (zie verwijzing naar eerder werk bij 3.1. Achtergrond en verderop bij 3.4. Onderzoekstrategie):
  - We weten hoe we de proef moeten opzetten (wat betreft type huisvesting) zodat er geen onderlinge beïnvloeding is tussen groepen anders dan alleen door de 'behandeling'.
  - We kunnen de waarden afzetten tegen de in ons eigen onderzoek bepaalde 'baseline-waarden' voor uitleesparameters t.a.v. microbiota en immuunsysteem.
  - We hebben onderzocht welke typen monsters we moeten nemen en wanneer.

### **3.3 Belang**

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Uiteindelijk beogen de onderzoekers met het overkoepelende project, waar deze proeven onderdeel van uitmaken, bij te dragen aan een diervriendelijke, duurzame, economisch rendabele en gezonde pluimveehouderij, inclusief veilige en goede vleesproducten voor de consument.

#### Maatschappelijk belang:

De vleeskuikenhoudery gaat gepaard met het gebruik van grote hoeveelheden antimicrobiële middelen. Hoewel een flinke reductie (72%) in antibioticumgebruik gerealiseerd is in de vleeskuikensector in 2016 ten opzichte van 2009 werden in 2016 nog steeds bij 27% van de reguliere vleeskuikenbedrijven antibiotica ingezet (Antibioticumgebruik pluimveesector in 2016, [www.avined.nl](http://www.avined.nl)). Naar verwachting zal deze dalende trend zich verder doorzetten, mede door andere innovaties en optimalisaties binnen de vleeskuikenhoudery. Goede voorbeelden hiervan zijn systemen waarbij o.a. gebruik wordt gemaakt van trager groeiende kuikens en een lagere dierbezettingsgraad. Ook krijgt het faciliteren van een goede start van de vleeskuikens steeds meer aandacht. Er zijn recentelijk diverse systemen ontwikkeld waarbij vleeskuikens eerder na uitkomst uit het ei toegang krijgen tot het voer omdat dit kan bijdragen aan een betere ontwikkeling van de darm en het immuunsysteem (de Jong et al. 2017 PLoS ONE 12(12): e0189350). Ook is er veel aandacht voor andere verbeteringen in de kuikenopvang in de eerste levensweek (<https://www.knmvd.nl/actueel/nieuws/item/10882560/Publicatie-Richtlijn-Veterinair-handelen-bij-vleeskuikens-rondom-de-opzet-en-in-de-eerste-levensweek-op-het-vleeskuikenbedrijf>) en is recentelijk een onderzoek gepubliceerd naar kritische succesfactoren voor een laag antibioticumgebruik bij vleeskuikens (<https://www.rijksoverheid.nl/documenten/rapporten/2017/11/01/onderzoek-naar-kritische-succesfactoren-voor-een-laag-antibioticumgebruik-bij-vleeskuikens>). Dit onderzoek heeft kritische bedrijfsprocessen en kenmerken (zoals ondernemersfactoren) geïdentificeerd die van invloed (kunnen) zijn op het (realiseren van) een laag antibioticumgebruik op vleeskuikenbedrijven. Dit onderzoek geeft aanknopingspunten voor vervolgacties en nader onderzoek naar causale relaties. Kortom, het bovenstaande geeft aan dat het belangrijk is dat er vanuit verschillende invalshoeken gekeken wordt naar manieren om de pluimveehouderij te optimaliseren in het belang van mens en dier.

Vooralsnog zijn digestieproblemen één van de vaak genoemde indicaties voor antibioticumgebruik bij pluimvee. Goed functionerende darmmicrobiota zijn cruciaal voor een goede darmontwikkeling,

ontwikkeling van het afweersysteem en benutting van het voer voor ontwikkeling en groei. Nieuwe kennis is noodzakelijk om het samenspel tussen verteringssysteem, darmmicrobiota, voeding en het afweersysteem enerzijds en gezondheid en productie van het dier anderzijds goed te begrijpen.

Als we dit beter begrijpen kunnen we deze processen mogelijk manipuleren door middel van gerichte aanpassingen in het voer en hiermee faciliteren dat er een dusdanige samenstelling van darmmicrobiota kan ontstaan die bijdraagt aan:

a) een goede ontwikkeling van het immuunsysteem van het kuikens, zodat deze al vanaf jonge leeftijd kan optreden tegen ziekteverwekkers. Hiermee wordt ook de kans op het oplopen van infecties, die bij de mens tot voedselinfecties kunnen leiden (zoals *Salmonella* en *Campylobacter*), verminderd. Ook zullen kippen die gezond zijn minder snel worden behandeld met antibiotica. Gezondere koppels pluimvee zorgen dus voor minder kans op overdracht van dierziekten of antibioticaresistentie van dier naar de mens via de consumptie van vlees.

b) een goede en efficiënte benutting van het voer, waarbij de kuikens kunnen groeien volgens een gezond groeipatroon gedurende de productieronde die voldoende efficiënt is (goede omzetting van voer in groei) maar niet tot gezondheidsproblemen leidt. Een efficiënte groei is niet alleen vanuit bedrijfseconomisch oogpunt gunstig, maar ook belangrijk in het kader van het beperken van de koolstofvoetafdruk voor de productie van vlees en de belasting van het milieu als gevolg van de mestproductie.

De kennis van dit project zal naar verwachting bijdragen aan een duurzame en gezonde pluimveehouderij en hopelijk in de toekomst aan een nieuwe generatie diervoeders die de gezondheid van vleeskuikens bevordert en nog beter is afgestemd op de behoeften van het vleeskuiken. Een pluimveehouderij met gezonde vleeskuikens draagt bij aan de veiligheid van voedingsmiddelen van dierlijke oorsprong (verbetering volksgezondheid), een lagere ecologische voetafdruk van de vleeskuikenproductie, en de acceptatie van de vleeskuikenhouderij door de maatschappij.

Dit betekent overigens geenszins dat we nastreven om de dieren nog sneller te laten groeien. Ook is dit project niet te beschouwen als een manier om een oplossing te bieden voor (darm)gezondheidsproblemen, dat in de plaats zou moeten komen van andere diergezondheid- en dierwelzijnsverbeteringen. Ons werk moet beschouwd worden als een integraal onderdeel van het gehele palet aan maatregelen die moeten bijdragen aan een meer duurzame manier van het houden van vleeskuikens. Waar het in het intensieve houderijsysteem van het recente verleden wellicht mogelijk was om stressoren, zoals een hoge dierbezettingsgraad, te snelle groei en niet-optimaal management t.a.v. van kuikenkwaliteit, klimaat, voeding en vaccinaties, te couperen/compenseren door het inzetten van antimicrobiële middelen, is een dergelijke 'quick-fix' niet meer realistisch, noch nastrevenswaardig. Hoewel we aanzienlijke diergezondheidsvoordelen voorzien van dit project zijn deze niet van dien aard dat andere maatregelen (zoals de eerdergenoemde optimalisaties in diermanagement, kuikenkwaliteit- en opvang en concepten waarin een langzamere groei en lagere bezetting worden gehanteerd) niet meer nodig zullen zijn. Wij beogen dus met name op het gebied van een zeer belangrijk onderdeel van het diermanagement, namelijk het onderdeel diervoeding, een bijdrage te leveren, en complementair te zijn aan andere optimalisaties in de vleeskuikenhouderij.

#### Wetenschappelijk belang

Kennis over de interactie tussen voeding en darmgezondheid kan de basis vormen voor de volgende generatie voedingssystemen en andere mogelijkheden tot verbetering van darmgezondheid. We weten uit eerder onderzoek vanuit de literatuur, en onze eigen voorlopige data, dat de darmmicrobiota in de eerste paar levensweken drastisch verandert wat betreft de typen bacteriën (ook wel naar verwezen als 'richness'). Het kuiken krijgt al bacteriën mee vanuit het moederdier/moederdierkoppel (direct via het legapparaat van de moederhen of via bacteriën aan de buitenkant van het ei die via poriën het ei kunnen binnengaan). Vervolgens vindt er blootstelling aan voedsel en bacteriën uit de omgeving (in de broederij, transport, op het bedrijf) plaats, wat veel invloed heeft op de ontwikkeling van de darmmicrobiota, maar ook op morfologische en functionele ontwikkeling van de darm en het immuunsysteem (Bar-Shira et al. 2006 Dev Comp Immunol 30: 930-41; Yin et al. 2010 ISME Journal 4:367-76; Bar-Shira et al. 2003 Dev

Comp Immunol 27: 147-57). Ook weten we dat vertraagde toegang tot voer (als er veel tijd verstrikt tussen uitkomen uit het ei en aankomen op het vleeskuikenbedrijf en kunnen eten) een grote impact heeft op deze processen (zie bv proefschrift van Simon 2016: Effects of early life conditions on immunity in broilers and layers, <http://edepot.wur.nl/371200>). Vanwege de onderlinge interactie tussen voeding, microbiota en het immuunsysteem, die moeilijk los van elkaar te bestuderen zijn, ontbreekt het nog aan kennis over hoe de interactie tussen de darmmicrobiota en de ontwikkeling en responsiviteit van het immuunsysteem in vleeskuikenkoppels exact verloopt. Wanneer we deze processen beter snappen, en weten hoe we de immuuncompetentie en daarmee de robuustheid van vleeskuikens gunstig kunnen beïnvloeden, kunnen voerfabrikanten en wetenschappelijke instellingen gerichte interventies ontwikkelen. Bovendien zullen de mechanismen die zorgen voor de interacties tussen voeding, darmmicrobiota en het afweersysteem, die we met dit onderzoek beogen bloot te leggen voor vleeskuikens, ook inzichten kunnen geven in hoe deze processen bij andere diersoorten, en mogelijk zelfs bij mensen, verlopen.

### **3.4 Onderzoeksstrategie**

#### **3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).**

Zoals reeds toegelicht in 3.1. zullen met behulp van data uit veld- en experimentele proeven (eerdere vergunningsaanvragen door onze groep en onze consortiumpartner) en van *in vitro* werk / informatie uit reeds uitgevoerd onderzoek de volgende vragen worden beantwoord:

- A. Hoe kun je een darmmicrobiotaprofiel karakteriseren in vleeskuikenkoppels (dat wil zeggen, een groep vleeskuikens die in 1 stal op een bedrijf worden opgezet en tot aan de slacht gehouden worden): welke soort monsters zijn hiervoor nodig en op welke tijdstippen in de productieperiode en hoe groot is de variatie tussen koppels? (AVD108002016442: *Veldstudie voor ontwikkeling van een methode om darmmicrobiota in vleeskuikenkoppels te karakteriseren en voor het bepalen van de variatie tussen en binnen koppels*). Deze veldstudie is ten tijde van het schrijven van deze aanvraag in volle gang. Wel zijn er al wat voorlopige analyses gedaan. Bij 3.4.2. wordt in detail beschreven hoe deze data wordt ingezet voor de opzet van de proeven in deze aanvraag.
- B. Hoe ziet de normale opbouw van de aangeboren afweer eruit bij vleeskuikens? (AVD108002017863: *Het karakteriseren van de ontwikkeling van het innate immuunsysteem van vleeskuikens*). Ook deze proef is ten tijde van het schrijven van deze aanvraag in volle gang. De focus ligt op twee belangrijke celtypen van het innate immuunsysteem, namelijk de natural killer cellen (NK) en de dendritische cellen (DC). Uit deze proef zal blijken of deze cellen, net als in zoogdieren, aanwezig zijn in de darm en of het aantal in deze jonge kuikens groot genoeg is voor een betrouwbare meting van aantallen en functie.
- C. Hoe moet de huisvesting in een proef zijn om te voorkomen dat er onderlinge beïnvloeding is tussen groepen anders dan alleen door de 'behandeling' (AVD10800-20171005: *Dynamiek van darmmicrobiota binnen en tussen hokken met vleeskuikens en de invloed ervan op uitkomsten van voedingsproeven*). Uit deze proef zal duidelijk worden of aan elkaar grenzende hokken, hokken met een kleine ruimte ertussen of isolatoren het beste zijn voor darmmicrobiota onderzoek. Wanneer er namelijk teveel uitwisseling van microbiota tussen groepen op kan treden, zullen behandelingseffecten moeilijker kunnen worden aangetoond. Deel 1 van deze proef is reeds uitgevoerd maar de resultaten van de darmmicrobiota analyses zijn nog niet beschikbaar. Pas als deze data beschikbaar is weten we welke variant(en) geschikt zijn en of we nog meer huisvestingsvarianten moeten uittesten in een vervolgprouf.
- D. Welke voercomponenten hebben *in vitro* (en evt. volgens ander *in vivo* onderzoek/literatuur) effecten op innate immuuncellen. Nadat een kuiken voer heeft opgenomen komen bij het verteringsproces bepaalde stoffen vrij die de activatie en het functioneren van immuuncellen stimuleren of juist afremmen. De screening van een groot aantal voercomponenten wordt momenteel uitgevoerd. Dit onderdeel is geen dierproef omdat de cellen hiervoor zijn verkregen uit embryo's.
- E. Welke voercomponenten hebben effect op darmmicrobiota en/of productieparameters en/of immuunparameters (proeven door onze consortiumpartner).

Deze, langs andere weg verkregen, informatie zal worden ingezet om twee typen dierproeven te kunnen opzetten, uitvoeren en interpreteren (zie 3.4.2. voor nadere details over de proeven en de figuur in de bijlage voor een visuele weergave). De informatie uit proef 1 en 2 en lopende experimenten van onze consortiumspartner over effecten van voercomponenten op darmmicrobiota en immuunparameters zal worden gebruikt voor het ontwerpen en opzetten van proef 3.

Dierproef 1: Het in kaart brengen van effecten van darmmicrobiota op de ontwikkeling van het immuunsysteem in jonge kuikens. Met deze proef willen we vaststellen in hoeverre de dynamiek in de samenstelling van darmmicrobiota in het vroege leven van vleeskuikens invloed heeft op de ontwikkeling van het immuunsysteem en andersom.

Dierproef 2: Invloed van specifieke voercomponenten op de ontwikkeling van het innate immuunsysteem en de darmmicrobiota. Met deze proef kunnen we meer inzicht krijgen in de fundamentele processen die een rol spelen bij de interacties tussen voeding, het afweersysteem en microbiota. We zullen onderzoeken welke voercomponenten invloed kunnen uitoefenen op het immuunsysteem, op darmmicrobiota of beiden en hoe groot deze effecten zijn. Hiermee kunnen we kansrijke voercomponenten identificeren voor verder veld- en experimenteel onderzoek door onszelf, en door onze consortiumspartner.

Wanneer we aan de hand van deze twee dierproeven zien dat het met bepaalde voercomponenten lukt om de darmmicrobiota zo te beïnvloeden dat er een samenstelling ontstaat die zorgt voor een goed functionerende darm (blijkend uit hoe de mest eruit ziet, voldoende goede groei, macroscopische en microscopische inspectie na sectie) en het bevorderen van de activiteit van het innate immuunsysteem, beschouwen we deze als kansrijk voor nader onderzoek. Met deze kansrijke voercomponenten wordt vervolgens nader onderzoek gedaan om te onderzoeken of deze daadwerkelijk vleeskuikens kunnen beschermen tegen een infectie en/of de negatieve gevolgen van een infectie op productieparameters. Deze infectieproeven zullen in een volgende projectvergunningsaanvraag worden aangevraagd worden hieronder beschreven in dierproef 3.

In de initiële aanvraag lag de nadruk op de interventies en of deze het innate immuun systeem en/ of microbiom kunnen beïnvloeden. De hypothese van dit onderzoek was dat we door middel van interventies het innate immuun systeem en/ of het microbiom kunnen beïnvloeden. Er is niet gekeken naar de relatie tussen een invloed van interventie op het immuunsysteem/ microbiom en de gezondheid van de dieren, alle experimenten worden immers uitgevoerd met gezonde vleeskuikens afkomstig van een commerciële broederij.

In de experimenten zoals beschreven in bijlage 3 willen we bestuderen of de interventies waarvan we nu weten dat ze een effect hebben op immuunsysteem en/of microbiom ook een effect hebben op de gezondheid van de dieren. Zoals beschreven in bijlage 3 is de hypothese dat een verhoogde activiteit van het innate immuun systeem ervoor zorgt dat de betreffende cellen beter in staat zijn om de Salmonella te doden. Daarnaast verwachten we dat de interventie gemedieerde aanpassingen in het microbiom minder ruimte laat voor kolonisatie van Salmonella in de darm. Omdat deze onderzoeksvraag volgt op de onderzoeksvraag zoals beschreven in de initiële aanvraag en uitgaat van de resultaten die uit deze aanvraag zijn voortgekomen, worden de infectieproeven toegevoegd als extra bijlage aan de huidige aanvraag.

Dierproef 3: Effect van voercomponenten op bescherming van vleeskuikens tegen een infectie met Salmonella enteritidis. Met deze proef willen we onderzoeken of het beïnvloeden van het aangeboren afweersysteem en de darmmicrobiota door voercomponenten inderdaad leidt tot gezondere kuikens die beter beschermd zijn tegen ziekteverwekkers zoals de bacterie *S. enteritidis*

Zoals beschreven in de onderzoekstrategie kent dit project verschillende fasen. We zijn begonnen met een *in vitro* screening van ongeveer 70 verschillende stoffen waarin hun effect op verschillende cellen van het innate afweersysteem is bestudeerd (D). Er is gekeken naar de activatie van macrofagen en naar de activatie van natural killer cellen omdat dit ook in het dier belangrijke componenten zijn van de vroege



afweer reactie. Alle stoffen zijn meerdere keren getest in de verschillende assays en hieruit kwamen 20 stoffen waarvan een duidelijk effect op de bestudeerde celtypen werd gezien.

Vervolgens is door de industriële partner een verdere selectie gemaakt op basis van beschikbaarheid, productiekosten, IP zaken etc. Dit leidde tot een selectie van 17 verschillende stoffen. Van deze lijst zijn er acht geselecteerd voor verder onderzoek op basis van hun effect in de *in vitro* studies en op basis van beschikbaarheid. Deze 8 stoffen zijn vervolgens getest in een *in ovo* experiment wat is uitgevoerd door de industriële partner. In deze experimenten worden de stoffen in verschillende concentraties ingespoten in 17 dagen oude eieren. Parameters die in deze experimenten worden gemeten zijn bv uitkomst, orgaan gewicht en het gewicht van de dooierzak rest. Ook is het aantal immuun cellen in het bloed bepaald. Op basis van deze resultaten worden concentraties van de toe te voegen stoffen bepaald die gebruikt zullen worden in een *in vivo* feed trial die wordt uitgevoerd door de industriële partner. De belangrijkste uitleesparameter is performance (gewicht, voeropname, voederconversie etc). Daarnaast worden monsters genomen om de samenstelling van het microbiom te bestuderen en zal bloed worden verzameld voor een analyse van het aantal immuun cellen. Ook zullen de stoffen die een positief effect hebben op performance en microbiome/ immuun cellen nader worden bestudeerd in de experimenten zoals beschreven in bijlage 2 waarin in het effect op het immuunsysteem in de darm in relatie tot microbiom zal worden geanalyseerd. Op basis van al deze resultaten zullen vier additieven worden geselecteerd voor de experimenten die in deze aanvraag beschreven zijn. Van deze stoffen weten we dan dat ze *in vitro* een positief effect hebben op cellen van het innate afweer systeem (*in vitro* screening), we weten dat we ze veilig aan kippen kunnen geven wat hun effect is op het aantal immuun cellen in bloed en groei van de embryo's (*in ovo* screening), weten we dat ze een positief effect hebben op performance (*in vivo* feed trial) en hebben we een idee van het effect van deze additieven op het immuunsysteem en/ of microbiom (*in vivo* feedtrial, experiment zoals beschreven in bijlage 2).

---

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

---

Dierproef 1: Het in kaart brengen van effecten van darmmicrobiota op de ontwikkeling van het immuunsysteem in jonge kuikens.

In deze proef gaan we bij vleeskuikens zo vroeg mogelijk in het leven minimaal 2 en maximaal 4 'extreme' darmmicrobiota profielen (met profiel wordt een specifieke samenstelling bedoeld) opwekken en vervolgens in kaart brengen hoe de darmmicrobiota ontwikkeling en de ontwikkeling van het innate immuunsysteem verloopt gedurende het leven van groepen vleeskuikens.

Met extreme darmmicrobiotaprofielen bedoelen we profielen waarvan we uit de literatuur en eigen onderzoek blijkt dat deze opvallende verschillen (in positieve of negatieve zin) geven in bijvoorbeeld productieprestaties of diergezondheid. Met data uit de lopende veldstudie (A) (zie overzicht in 3.4.1.) leren we hoe de algemene variatie is van de darmmicrobiota, maar hebben we ook data over individuele diergewichten, laesiescores van de darm, histologie van de darm, en koppelprestaties. Aan de hand daarvan hopen we meer inzicht te krijgen in hoe de darmmicrobiota eruit ziet van dieren/koppels die juist wel of juist niet goed functioneren. Uit onderzoek van Stanley et al. (2016. *Front Microbiol* 7:187) weten we bv. dat bacteriën van de *Lachnospiraceae* familie positief gecorreleerd zijn met goede voederconversies. Ook lijkt het erop dat bacteriën die geassocieerd zijn met butyraat productie een positieve invloed hebben op gezondheid en productie (Onrust et al. 2015 *Frontiers Vet Sci* 2015 2: 75). Uit dit type onderzoek blijkt echter ook dat het vooralsnog lastig blijkt om eenduidig aan te geven welke type bacteriën gunstig zijn en welke niet.

Daarom spreken we van 'extreme' darmmicrobiota omdat we wellicht de uitersten hierin moeten opzoeken om effecten op het immuunsysteem te kunnen meten. Dat betekent dat we profielen bij de kuikens moeten opwekken die sterk afwijkend zijn ten opzichte van profielen die ontstaan als kuikens een 'normale ontwikkeling' doormaken.

Aangezien direct na uitkomst de ontwikkeling van de darm, veranderingen in de samenstelling van darmmicrobiota en ontwikkeling van het innate immuunsysteem beginnen, en lange termijn effecten hebben, willen we zo vroeg mogelijk na uitkomst verschillende darmmicrobiota profielen opwekken. Dit

---

kan het beste worden bewerkstelligd door de dieren zo vroeg mogelijk te inoculeren met darmmicrobiota afkomstig uit donorkippen. Dit is al door diverse auteurs beschreven (o.a. Volf et al. 2016 PLoS ONE 11(9): e0163932; Polansky et al. 2016 Appl Environ Microbiol 82: 1569-76; Yin et al. 2010 The ISME J 4: 367-76) met goede resultaten.

Om de darmmicrobiota van de kuikens in de proef voldoende onderscheidend te krijgen tussen de testgroepen moeten de donorkippen 'extreme profielen' hebben. Uit de literatuur weten we dat deze op verschillende manieren kunnen worden opgewekt. Je kunt bv. dieren eerst germ-free opfokken of met antibiotica kiem-arm maken en daarna specifieke monocultures van bacteriën toedienen (dit is vooral iets wat bij muizen wordt gedaan), specifieke antibiotica geven, met bepaalde voercomponenten proliferatie van specifieke bacteriën stimuleren (prebiotische benadering) of direct bepaalde soorten bacteriën toedienen (probiotische benadering). Voor het verkrijgen van een ongunstig profiel zijn veel diermodellen bekend waarbij necrotiserende enteritis wordt opgewekt. Hierbij wordt bv. veel vismeel gegeven waardoor overgroei met *Clostridium perfringens* kan ontstaan.

Voor de andere kant van het spectrum kun je met prebiotica of wellicht voercomponenten die in (C) of (E) zijn getest of probiotica manipuleren naar een samenstelling met veel typen bacteriën die gunstige eigenschappen hebben.

Daarnaast geldt dat de darminhoud van oudere kippen sowieso al een duidelijk ander profiel heeft dan kuikens kort na uitkomst en ook ingezet kan worden (zoals gedaan door Volf 2016 en Polansky 2016). Een andere benadering (zoals gedaan door Yin 2010) is om vanuit commerciële pluimveebedrijven dieren te bemonsteren. In ons geval zouden we de microbiota samenstelling van kippen van verschillend presterende bedrijven uit de veldstudie (A) kunnen screenen (bv koppels met zeer goede groei en goede gezondheid versus 'probleemkoppels'). Indien de microbiota samenstellingen van verschillende bedrijven voldoende onderscheidend zijn kunnen enkele dieren van die bedrijven ingezet worden als donoren. Recentelijk is ook een onderzoek gepubliceerd (Donaldson et al. 2017 PeerJ: e3587) waarbij het aanbrengen van caecuminhoud van oudere dieren aan het oppervlakte van het ei werd toegepast. Dit bleek onvoldoende succesvol om een bepaald profiel te transplanteren, maar wellicht wordt deze techniek nog verbeterd en blijkt dat wel een optie voor onze proeven te zijn. De keus voor de techniek zal afhangen van de nieuwste inzichten tegen de tijd van de proef en hetgeen we vinden in de veldstudie (A) en lopende onderzoeken (C) en (E).

Voor het in kaart brengen van de darmmicrobiota ontwikkeling in de tijd weten we straks uit (A) op welke momenten en met welke soort monsters we de veranderingen in de samenstelling van darmmicrobiota gedurende het leven goed kunnen meten. Er wordt in deze studie namelijk gekeken naar in hoeverre darmmonsters uit verschillende plekken van het darmstelsel of blinde darm droppings, cloacaswabs of strooiselmonsters bv. vergelijkbare informatie geven. Deze zijn op verschillende momenten in de tijd genomen tussen dag 0 en 42. Uit de voorlopige analyses weten we al dat in de eerste 2 weken veel meer veranderingen optreden dan later in de ronde. Dit helpt bij deze proeven om de beste momenten te selecteren waarin we voldoende onderscheidend vermogen hebben om verschillen tussen groepen te kunnen vaststellen. Met de data van (B) weten we hoe de normale ontwikkeling van de innate afweer is zodat we kunnen vaststellen of dit anders is bij bepaalde darmmicrobiota profielen. De opzet van de proef wordt uitgevoerd op de manier die volgens (C) het beste is gebleken. Uit de resultaten van (C) zal blijken in welke mate een hok geïsoleerd moet zijn van een ander hok, zodat er niet teveel uitwisseling van darmmicrobiota kan optreden, zodat we verschillen tussen behandelingsgroepen niet goed meer kunnen vaststellen.

#### Dierproef 2: Invloed van specifieke voercomponenten op de ontwikkeling van het innate immuunsysteem en de darmmicrobiota

In deze proef gaan we bepaalde voercomponenten, die volgens eerder (*in vitro* of *in vivo*) onderzoek hebben laten zien dat deze het immuunsysteem kunnen beïnvloeden, *in vivo* uittesten vanaf een zo jong mogelijke leeftijd. In proef 1 wilden we testen of er überhaupt effect te meten is van andere microbiota op het immuunsysteem. In proef 2 gaan we zorgen dat kuikens op 'natuurlijkere wijze' andere darmmicrobiota krijgen, door ze met bepaalde componenten in het voer te beïnvloeden. Er wordt

gekeken wat de invloed is van deze voercomponenten op de ontwikkeling van het (innate) immuunsysteem en de darmmicrobiota gedurende het leven van groepen vleeskuikens. De data van (D) en (E) zullen bepalend zijn voor de keuze van de voercomponenten. Met de data van (A), (B) en dierproef 1 kan goed worden bepaald hoe deze voercomponenten de 'normale' ontwikkeling van darmmicrobiota en innate immuunsysteem veranderen en welke meetmomenten en parameters het meest geschikt zijn om te gebruiken. De uitkomsten van (C) en dierproef 1 zullen bepalend zijn voor de wijze waarop de proef wordt uitgevoerd.

Dierproef 3: Effect van voercomponenten op bescherming van vleeskuikens tegen een infectie met *Salmonella enteritidis*.

Voor deze ~~proof-of-concept~~ vervolg experimenten zullen we de reactie van vleeskuikens op een infectie met de bacterie *Salmonella* bestuderen. *Salmonella* is een ziekteverwekker die veel voorkomt in pluimvee. In jonge dieren kan het ernstige ziekteverschijnselen veroorzaken en ook sterfte. In oudere dieren treden doorgaans geen symptomen op, maar deze dieren zijn wel drager en kunnen de bacterie ook uitscheiden en verspreiden. Daarnaast zijn bepaalde varianten van de *Salmonella* bacterie zoals *S. enteritidis* overdraagbaar op mensen. Dit leidt tot voedselinfecties bijvoorbeeld na het eten van besmet vlees of eieren. De aanwezigheid van *S. enteritidis* in een gastheer kan onder andere worden aangetoond door middel van bacteriële tellingen organen zoals milt en darm van of cloaca-monsters op specifieke agar platen en titer-bepalingen van antistoffen in bloed, die twee weken na *S. enteritidis* infectie maximaal aanwezig zijn (Desmidt *et al.* 1998 *Vet Im Immunopath* 63 (4):355-367).

Op basis van dierproef 2 en lopende experimenten bij onze consortiumpartner worden voerinterventies geselecteerd die een positief effect op darmmicrobiota en/of immuunsysteem hebben. Het effect van deze voerinterventies op de gevolgen van een infectie met *S. enteritidis* in jonge vleeskuikens zal worden bestudeerd. Naast het bepalen van de hoeveelheid bacteriën en de hoeveelheid *Salmonella* specifieke antilichamen in bloed zullen we ook de samenstelling van de darmmicrobiota en de rol van het aangeboren afweersysteem bestuderen. Op deze manier willen we meer inzicht krijgen in het mechanisme wat leidt tot een mogelijke bescherming tegen *S. enteritidis*. Daarnaast willen we ook de transmissie van *S. enteritidis* bestuderen, omdat een afname van de transmissie uiteindelijk zal leiden tot minder geïnfecteerde vleeskuikens, minder geïnfecteerd vlees, en dus ook minder overdracht op mensen.

Vanuit literatuur is bekend dat voedingscomponenten bescherming kunnen bieden tegen een infectie met *Salmonella*. Ziekteverschijnselen na een infectie met *S. enteritidis* namen af na interventies met natriumbutyraat (Fernández-Rubio 2009) en peptides van een gram-positieve bodembacterie (Kogut 2013). Ook de samenstelling van de darmmicrobiota kan zorgen voor bescherming tegen infectie van *S. enteritidis*. Deze bescherming is gecorreleerd aan een verhoogde expressie van innate immuun-gerelateerde genen (Varmuzova 2016). Dus zowel darmmicrobiota samenstelling, het innate immuunsysteem en voedingscomponenten spelen een rol in bescherming tegen *Salmonella* infecties. Vandaar dat voor deze ~~proof-of-concept~~ vervolg experimenten gekozen is voor infecties met *S. enteritidis*.

In de proeven beschreven in deze bijlage willen we het effect van voerinterventies op bescherming tegen een *Salmonella* infectie onderzoeken in experimenten waarin het mechanisme achter deze bescherming centraal staat. De geselecteerde additieven kunnen a. de cellen van het innate immuun systeem versterken waardoor deze beter in staat zijn de *Salmonella* te doden of b. het microbiom beïnvloeden waardoor de *Salmonella* zich moeilijker kan vestigen in de darm. Dit is anders dan in eerdere studies waarin het effect van butyrate (Fernández-Rubio 2009) of bepaalde peptides (Kogut 2013) op kolonisatie van *Salmonella Enteritidis* bestudeerd is maar niet in detail is gekeken naar het onderliggende mechanisme. Kogut *et al* beschrijft mRNA levels van immuun gerelateerde genen, dit is wezenlijk anders dan het bestuderen van de functie van de cellen van het innate immuunsysteem. Het microbiom is in beide studies niet bestudeerd. In ene recente studie van Zhen *et al* *Poultry sciences* 2018 wordt het effect van een bepaald probioticum (*Bacillus coagulans*) op microbiom en *Salmonella* infectie bestudeerd. Ook hier wordt wel gekeken naar mRNA niveaus van enkele immuun gerelateerde genen, maar wordt de activiteit van cellen van het immuunsysteem niet gemeten.

Zoals toegelicht in bijlage 3 (experimentele aanpak en belangrijkste uitleesparameters) bestaat er een duidelijke relatie tussen een sterke innate afweer reactie en bescherming tegen Salmonella. Niet alleen leidt een sterke natural killer cel activiteit tot bescherming van muizen tegen *S. typhimurium* infectie (Schafer and Eisenstein 1992), ook kunnen humane macrophagen die geïnfecteerd zijn met *S. enteritidis* NK cellen activeren, en deze NK activiteit resulteert in een afname van het aantal bacteriën (Lapaque 2009). In kippen zijn dergelijke studies waarin in detail is gekeken naar cellen van het innate immuunsysteem en Salmonella nog niet beschreven.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Het stappenplan toegelicht in voorgaande paragrafen is als volgt samen te vatten:

De eerste reeds uitgevoerde experimenten in het overkoepelende NWO programma waren erop gericht om de monsternamen protocollen en de normale longitudinale baseline waarden (en variatie daarin) vast te stellen voor de darmmicrobiota dynamiek en de ontwikkeling van het innate immuunsysteem in vleeskuikens. Hiertegen kunnen de uitkomsten van de proeven in deze projectaanvraag goed worden afgezet. Ook zijn validatieproeven gedaan om vast te stellen hoe de optimale opzet moet zijn van een proef gericht op darmmicrobiota waarbij verschillende behandelingsgroepen met elkaar worden vergeleken. Om een indruk te krijgen welke darmmicrobiota profielen gecorreleerd zijn met gezondheid en productieprestaties zijn wordt met name in veldstudies (door ons en onze consortiumpartner) geïnventariseerd wat verschillen zijn tussen individuele dieren, koppels, en bedrijven. Ook is tegen de tijd dat deze dierproeven worden gedaan bekend welke voercomponenten invloed kunnen uitoefenen op het immuunsysteem en/of darmmicrobiota, aan de hand van *in vitro* en *in vivo* screening in experimenten en veldstudies door onze groep en door onze consortiumpartner als onderdeel van R&D activiteiten.

Al deze informatie komt samen in deze projectaanvraag.

Dierproef 1:

In deze proef willen we allereerst onderzoeken of, als we hele grote veranderingen aanbrengen in de darmmicrobiota van jonge kuikens, we überhaupt een invloed op het innate immuunsysteem kunnen meten. Daarom proberen we met 'extreme' profielen een voldoende groot contrast aan te brengen tussen groepen kuikens om de kans om iets te kunnen meten te vergroten.

Go / no go: als we geen enkele invloed kunnen zien op het innate immuunsysteem moeten we weer terug naar het pilotstadium, en in een proef van type (B) op zoek gaan naar andere manieren om de respons van het innate en/of adaptieve immuunsysteem wel te kunnen meten. Pas wanneer duidelijk is welke metingen betere resultaten kunnen geven wordt dierproef 1 herhaald.

Dierproef 2:

Wanneer uit dierproef 1 naar voren komt dat een andere beginsamenstelling van de darmmicrobiota bij kuikens invloed uitoefent op de ontwikkeling van het immuunsysteem willen we in dierproef 2 een meer natuurlijk proces nabootsen door de kuikens vanaf een vroege leeftijd bloot te stellen aan bepaalde voercomponenten. De invloed van deze voercomponenten op de ontwikkeling van het immuunsysteem en effecten op de samenstelling van de darmmicrobiota worden hierbij onderzocht. De keuze van de componenten hangt af van uitkomsten uit (C), (D) en (E).

Go / no go: Wanneer de testen in het lab geen activiteit van het vroege afweersysteem laten zien na toediening van de stoffen of wanneer er geen voercomponenten gevonden worden die de darmmicrobiota beïnvloeden zal het dierexperiment met de verschillende voercomponenten niet plaatsvinden

Dierproef 3: Vervolgproeven (buiten de scope van deze aanvraag):

Uiteindelijk gaan we voercomponenten die een duidelijk effect laten zien in dierproef 2 ook testen onder een challenge met *Salmonella* een (nog nader te bepalen veelvoorkomende) infectie bij vleeskuikens, maar dat valt buiten de scope van deze aanvraag.

Go / no go: Wanneer dierproef 2/ lopende experimenten bij onze consortiumpartner geen effect op de ontwikkeling van het immuunsysteem of geen effecten hebben op de samenstelling van de darmmicrobiota zal het dierexperiment met de *Salmonella* infectie niet plaatsvinden.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Het in kaart brengen van effecten van darmmicrobiota op de ontwikkeling van het immuunsysteem in jonge kuikens.
2	Invloed van specifieke voercomponenten op de ontwikkeling van het innate immuunsysteem en de darmmicrobiota
3	Effect van specifieke voercomponenten op bescherming van vleeskuikens tegen een infectie met <i>Salmonella enteritidis</i>
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : AVD1080020174425-1  
2. Titel van het project : Onderzoek naar interacties tussen darmmicrobiota en de ontwikkeling van immuniteit bij vleeskuikens  
3. Titel van de NTS : Onderzoek naar de wisselwerking tussen darmflora en het afweersysteem bij vleeskuikens

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer : AVD1080020174425

5. Contactgegevens DEC

- Naam DEC : DEC Utrecht  
Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247  
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 18-06-2019  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 19-06-2019  
 anderszins behandeld:  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 27-06-2019/12-07-2019  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 29-07-2019

7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 27-06-2019
- Datum antwoord: 12-07-2019
- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: Bij het lezen van proefplan valt op dat resultaten die reeds in het vigerende project zijn behaald, ontbreken. Aannemelijk lijkt dat juist die resultaten hebben geleid tot het kunnen formuleren van de criteria van de specifieke voercomponenten voor de infectieproeven.

U geeft aan dat 4 additieven worden getest in de infectie-experimenten. Deze additieven zijn geselecteerd uit eerder in vitro en in vivo onderzoek van dit project. Om een goede afweging te kunnen maken voor het gebruik van 3047 kuikens, waarvan 69% verwacht met matig ongerief, is het nodig resultaten uit voorgaande studie te vermelden, welke de selectie van deze 4 voeradditieven als 'kansrijk voor een succesvolle infectiestudie' rechtvaardigen.

*Zoals beschreven in de initiële aanvraag kent dit deel van het project verschillende fasen. We zijn begonnen met een in vitro screening van ongeveer 70 verschillende stoffen waarin hun effect op verschillende cellen van het innate afweersysteem is bestudeerd. Er is gekeken naar de activatie van macrofagen en naar de activatie van natural killer cellen omdat dit ook in het dier belangrijke componenten zijn van de vroege afweer reactie. Alle stoffen zijn meerdere keren getest in de verschillende assays en hieruit kwamen 20 stoffen waarvan een duidelijk effect op de bestudeerde celtypen werd gezien.*

*Vervolgens is door de industriële partner een verdere selectie gemaakt op basis van beschikbaarheid, productiekosten, IP zaken etc. Dit leidde tot een selectie van 17 verschillende stoffen. Van deze lijst zijn er acht geselecteerd voor verder onderzoek. Deze acht zijn gekozen op basis van hun effect in de in vitro studies en op basis van beschikbaarheid. Omdat deze acht stoffen niet eerder aan kippen zijn toegediend hebben we in overleg met de industriële partner en de IvD ervoor gekozen om niet direct dierproeven te gaan doen maar te starten met een in ovo experiment. Dit wordt door de industriële partner standaard gebruikt als eerste screening voor stoffen die nog niet eerder aan kippen zijn toegediend om meer te weten te komen over de te geven dosis en mogelijke toxiciteit. In deze experimenten worden de stoffen in verschillende concentraties ingespoten in 17 dagen oude eieren. Parameters die in deze experimenten worden gemeten zijn bv uitkomst, orgaan gewicht en het gewicht van de dooierzak rest. Ook hebben we gekeken naar aantallen immuun cellen in bloed. Dit in ovo experiment is in de derde week van juni 2019 uitgevoerd en de resultaten zijn in de tweede helft van juli 2019 bekend. Op basis van deze resultaten worden concentraties van de toe te voegen stoffen bepaald die gebruikt zullen worden in een in vivo feed trial die wordt uitgevoerd door de industriële partner. Deze trial start eind juli en zal tot half augustus 2019 duren. De belangrijkste uitleesparameter is performance (gewicht, voeropname, voederconversie etc). Daarnaast worden monsters genomen om de samenstelling van het microbiom te bestuderen en zal bloed worden verzameld voor een analyse van het aantal immuuncellen in bloed. De resultaten van deze trial zijn eind augustus/ begin september bekend. Op basis van de resultaten zullen vier additieven worden geselecteerd voor de experimenten die in deze aanvraag beschreven zijn. Van deze stoffen weten we dan dat ze in vitro een positief effect hebben op cellen van het innate afweer systeem (in vitro screening), we weten dat we ze veilig aan kippen kunnen geven wat hun effect is op het aantal immuun cellen in bloed en groei van de embryo's (in ovo screening), weten we dat ze een positief effect hebben op performance (in vivo feed trial) en hebben we een idee van het effect van deze additieven op het immuunsysteem en/ of microbiom.*



*In de proeven beschreven in deze bijlage willen we het effect van deze vier stoffen op bescherming tegen een Salmonella infectie onderzoeken in experimenten waarin het mechanisme achter deze bescherming centraal staat. De geselecteerde additieven kunnen a. de cellen van het innate immuun systeem versterken waardoor deze beter in staat zijn de Salmonella te doden of b. het microbiom beïnvloeden waardoor de Salmonella zich moeilijker kan vestigen in de darm. Dit is anders dan in eerdere studies waarin het effect van butyrate (Fernández-Rubio 2009) of bepaalde peptides (Kogut 2013) op kolonisatie van Salmonella Enteritidis bestudeerd is maar niet in detail is gekeken naar het onderliggende mechanisme. Kogut et al beschrijft mRNA levels van immuun gerelateerde genen, dit is wezenlijk anders dan het bestuderen van de functie van de cellen van het innate immuunsysteem. Het microbiom is in beide studies niet bestudeerd. Zoals toegelicht in bijlage 3 (experimentele aanpak en belangrijkste uitleesparameters) bestaat er een duidelijke relatie tussen een sterke innate afweer reactie en bescherming tegen Salmonella. Niet alleen leidt een sterke natural killer cel activiteit tot bescherming van muizen tegen S. typhimurium infectie (Schafer and Eisenstein 1992 Infect Immun 60(3):791-797), ook kunnen humane macrophagen die geïnfecteerd zijn met S. enteritidis NK cellen activeren, en deze NK activiteit resulteert in een afname van het aantal bacteriën (Lapaque et al 2009 J Immunol 182 (7): 4339-4348).*

*In de huidige aanvraag staat beschreven dat de in vitro fase gevolgd wordt door een in vivo fase (bijlage 2) waarin we maximaal 6 geselecteerde componenten aan kippen willen geven en het effect op microbiom en op het innate immuunsysteem willen bestuderen. Door discussies en de goede samenwerking met de industriële partner is ervoor gekozen om eerst een in ovo experiment te doen gevolgd door een grote feed trial in vivo en dan pas de meer kleinschalige experimenten in onze eigen dierfaciliteiten. De reden voor het toevoegen van het in ovo experiment is dat we eindigden met een selectie van stoffen die niet eerder aan kippen waren toegediend, waardoor er geen kennis beschikbaar was over mogelijke toxische effecten en de te geven dosis. We hebben in overleg met de IvD toen besloten om een deel van de toegekende dieren uit bijlage 2 in te zetten voor dit in ovo experiment om meer te weten te komen over mogelijke toxiciteit van de stoffen en een inschatting te kunnen maken van de dosis (WZG1AVD1080020174425, mei 2019). De reden om eerst een grootschalige in vivo feed trial te doen is vanwege de samenwerking in dit project met een industriële partner. We kunnen additieven selecteren die in kippen het afweer systeem versterken, of het microbiom zo beïnvloeden dat er minder ruimte is voor ziekmakende bacteriën maar als dat uiteindelijk gaat ten koste van bv groei is dit project commercieel gezien minder aantrekkelijk. Op basis van al deze stappen kunnen we nieuwe additieven selecteren waarvan we weten dat ze het immuunsysteem en/ of het microbiom zullen beïnvloeden voor de experimenten beschreven in deze bijlage.*

- 3.1 Achtergrond: Wat zijn de gevolgen van deze wijziging voor het lopende project? Betekend dit dat sommige proeven niet meer gedaan hoeven te worden? Is er een effect op de aantallen in te zetten dieren in het lopende project?