

Inventaris Wob-verzoek W23-03		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 202115002	reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	Aanvraag projectvergunning, d.d. 10-06-2021				x		x		x	
2	Projectvoorstel bij aanvraag				x				x	
3	Bijlage dierproeven 1 bij aanvraag				x				x	
4	Bijlage dierproeven 2 bij aanvraag				x		x		x	
5	NTS bij de aanvraag			x						
6	E-mail aan DEC om advies projectvergunning, d.d. 10-06-2021				x				x	
7	DEC-advies, d.d. 20-07-2021				x		x		x	
8	Projectvoorstel na DEC advies				x				x	
9	Bijlage dierproeven 1 na DEC advies				x				x	
10	Bijlage dierproeven 2 na DEC advies				x		x		x	
11	NTS na DEC advies			x						
12	Adviesnota aan CCD, d.d. 20-07-2021 _met opmerkingen				x		x		x	x
13	Adviesnota aan CCD, d.d. 23-07-2021				x		x		x	x
14	E-mail CCD aan projectaanvrager, d.d. 23-07-2021				x		x		x	
15	Reactie vergunninghouder op vragen CCD				x		x		x	
16	Projectvoorstel na CCD vragen				x				x	
17	NTS na CCD vragen en definitieve versie			x						
18	Adviesnota aan CCD, d.d. 26-08-2021				x		x		x	x
19	Beschikking, d.d. 26-08-2021				x		x		x	
20	E-mail CCD aan DEC, terugkoppeling aanvraag projectvergunning, d.d. 13-09-2021				x		x		x	

- Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens
- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
 - Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
 - Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
 - Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	5.1 lid2h
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde KvK-nummer	5.1 lid2h 5.1 lid2e 5.1 lid2h
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.	Straat en huisnummer Postbus Postcode en plaats Iban Tenaamstelling van het rekeningnummer	5.1 lid2h
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker	(Titel) naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer Email adres	5.1 lid2e onderzoeker 5.1 lid2e 5.1 lid2e [X] Dhr. [] Mw.
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer Email adres	[] Dhr. [] Mw.
1.6	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon	(Titel) naam en voorletters	[] Dhr. [] Mw.

die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

Functie
Afdeling
Telefoonnummer
Email adres

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
 Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag
 Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
 Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
 Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het Dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2

- Wijziging op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het Dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

- 2.3 Is dit een wijziging voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
 Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
 Nee > Ga verder met vraag 3

- 2.4 Is dit een melding voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
 Nee > Ga verder met vraag 3
 Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en Startdatum
einddatum van het project?
1-10-2021
30-9-2026
- 3.2 Wat is de titel van het project?
Verbetering voedselveiligheid door (1) ontwikkeling en validatie van de celkweek voor aantonen van levende Toxoplasma gondii parasieten in vlees als alternatief voor de muisbioassay en (2) bepalen van het effect van zout en andere toevoegingen in rauwe vleeswaren op T. gondii hiermee
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
Bepalen van het effect van zout en andere toevoegingen in rauwe vleeswaren op Toxoplasma gondii met een nieuwe proefdiervrije methode

3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	5.1 lid2h
		Postadres	5.1 lid2h
		E-mailadres	

4 Betaalgegevens

4.1	Om welk type aanvraag	[X] Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1673
4.2	gaat het?	[] Wijziging €
	Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.	[] Via een eenmalige incasso
	Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.	[X] Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1	Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht [X] Projectvoorstel (PP) inclusief DAP [X] Niet-technische samenvatting
		Overige bijlagen, indien van toepassing [] Melding Machtiging [X] inkooporder 5.1 lid2h

6 Ondertekening

6.1	Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:	Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart: <ul style="list-style-type: none"> • dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn. • dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
-----	--	---

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	5.1 lid2e
Functie	gemandateerd vergunninghouder
Plaats	5.1 lid2h
Datum	10-6-2021
Handtekening	5.1 lid2e



Centrale Commissie Dierproeven

Form

Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- | | | |
|-----|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 5.1 lid2h |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | 5.1 lid2h |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Verbetering voedselveiligheid door (1) ontwikkeling en validatie van de celkweek voor aantonen van levende Toxoplasma gondii parasieten in vlees als alternatief voor de muisbioassay en (2) bepalen van het effect van zout en andere toevoegingen in rauwe vleeswaren op T. gondii hiermee |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|--|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input type="checkbox"/> Basic Research |
| | | <input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research |
| | | <input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production |
| | | <input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare |
| | | <input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures |
| | | <input type="checkbox"/> Higher education or training |
| | | <input type="checkbox"/> Forensic enquiries |
| | | <input type="checkbox"/> Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures |

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.1.

Introductie

Dit project betreft onderzoek naar voedselveiligheid met betrekking tot de parasiet *Toxoplasma gondii*. Mensen kunnen geïnfecteerd worden met *T. gondii* door het eten van rauw of onvoldoende verhit vlees en dit project beoogt de risico's hiervan te verminderen.

Om de context van het projectvoorstel te duiden wordt in dit eerste deel algemene informatie gegeven over vleesconsumptie en vleesproductie. Verder wordt ook informatie gegeven over voedselveiligheidsrisico's in het algemeen en de beheersing van deze risico's.

Gezond en veilig vlees

De relatie tussen vleesconsumptie en een gezond en duurzaam voedingspatroon is een prominent onderwerp in het maatschappelijke debat. Er is onderzoek naar de invloed van vlees eten op gezondheid, duurzaamheid en klimaat. Ook worden er cijfers verzameld over vleesconsumptie, wordt er gekeken naar consumentengedrag en -voorkeuren en wordt onderzoek gedaan naar vleesvervangers en alternatieve eiwitbronnen.

Wanneer een consument vleeswaren (bewerkte producten van vlees) eet dienen deze veilig te zijn. Deze voedselveiligheid is de focus van dit voorstel en het betreft met name de voedselveiligheid gerelateerd aan de parasiet *T. gondii*, één van de ziekteverwekkers die door vlees wordt overgedragen op de mens.

Vleesconsumptie in Nederland

De gemiddelde Nederlander eet ruim 38 kilo vlees per jaar, ongeveer 11 kg daarvan wordt gegeten als vleeswaren. In de periode 2010 – 2015 was er sprake van een lichte daling van de vleesconsumptie, maar sinds 2018 is er weer een lichte stijging. Ongeveer de helft van de Nederlanders noemt zichzelf 'flexitariër'. Dat wil zeggen dat ze minimaal drie keer per week geen vlees bij de warme maaltijd eten. Het aandeel vegetariërs ligt stabiel op iets minder dan vijf procent van de Nederlandse bevolking **5.1 lid2h**

Deng et al., 2020 maakte op basis van gegevens van de Nederlandse Nationale Voedselconsumptiepeiling 2007–2010 een lijst van 83 van de meest gegeten producten van vlees. Deze lijst omvat 36 producten afkomstig van varkensvlees, 27 van rundvlees, 8 van kalfsvlees, 7 van lamsvlees, 2 van rundvlees / varkensvlees gemengd en 2 van schapenvlees. Verreweg de meeste producten van vlees op deze lijst worden verhit tijdens de bereiding. De lijst bevat 18 vleesproducten die niet verhit worden tijdens de productie en direct gegeten worden. Dit betreft 3 rundvlees, 13 varkensvlees en 2 rundvlees/varkensvlees gemengde producten van vlees waaronder bijvoorbeeld droge worsten, ham en filet americain (zie lijst in Deng et al., 2020).

Toelichting rauw gegeten vlees: dit vlees wordt in tegenstelling tot vers vlees bewerkt en worden er zout en andere additieven zoals natriumacetaat en natriumlactaat aan toegevoegd.

Vleesproductie in Nederland

Naast de voorziening voor eigen consumptie produceert Nederland jaarlijks veel vlees voor andere landen. Dit vlees wordt geëxporteerd naar meer dan 140 landen over de hele wereld. Verspreid over al die landen eten ruim 100 miljoen mensen vlees en vleeswaren die uit Nederland komen (Centrale Organisatie voor de Vleessector – COV; www.cov.nl).

Voedselveiligheidsrisico's (van voedsel en van vlees)

Het RIVM onderzoekt elk jaar de Nederlandse consumptie en bepaalt hoeveel mensen ziek worden of sterven aan 14 voedsel-gerelateerde ziekteverwekkers die via voedsel worden overgedragen: *Campylobacter* spp., STEC O157, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* toxine, *Clostridium perfringens* toxine, *Staphylococcus aureus* toxine, Norovirus, Rotavirus, Hepatitis A virus, Hepatitis E virus, *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *Toxoplasma gondii*. De 14 ziekteverwekkers kunnen niet alleen via voedsel in het lichaam van de mens terechtkomen. Het kan

ook via het milieu (bijvoorbeeld via oppervlaktewater), dieren, en van mens op mens. Het aandeel van deze routes verschilt per ziekteverwekker.

De ziektelast wordt uitgedrukt in DALY's (Disability Adjusted Life Year), een internationale maat voor het aantal gezonde levensjaren dat verloren gaat aan ziekte of voortijdig overlijden. Het totaal aantal DALY's die deze 14 ziekteverwekkers in 2019 veroorzaakten is 11.000 DALY's, dus 11.000 verloren levensjaren. Iets meer dan 1700 DALY's (15%) werd in verband gebracht met vlees (d.w.z. gevogelte, varkensvlees, rundvlees en lamsvlees) (Lagerweij et al., 2020).

Beheersen van voedselveiligheidsrisico's

Om de voedselveiligheid te vergroten wordt er veel aandacht besteed aan het veilig produceren van voedsel (inclusief vlees).

- De rijksoverheid heeft wetgeving opgesteld waar producenten van voedingsmiddelen aan moeten voldoen. Zo worden in de 'Wet dieren' eisen aan de microbiologische veiligheid van vlees en andere dierlijke producten gesteld en wordt in de 'Warenwet' van voedingsmiddelenbedrijven geëist dat deze moeten zorgen voor de veiligheid van voedsel; consumenten mogen er niet ziek van worden.
- Namens de overheid houdt de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA) hier toezicht op.
- Niet alleen de rijksoverheid stelt voorwaarden en houdt toezicht. Ook de sector zelf levert hier een bijdrage aan, zowel bij de primaire productie als bij de verwerking werkt ze aan bewustwording van producenten van voedselveiligheidsrisico's en stelt normen vast voor een veilige productie.
- Tot slot is ook voorlichting van de consument over mogelijke voedselveiligheidsrisico's van belang evenals voorlichting over de veilige bereiding van voedingsmiddelen.

Toxoplasma gondii

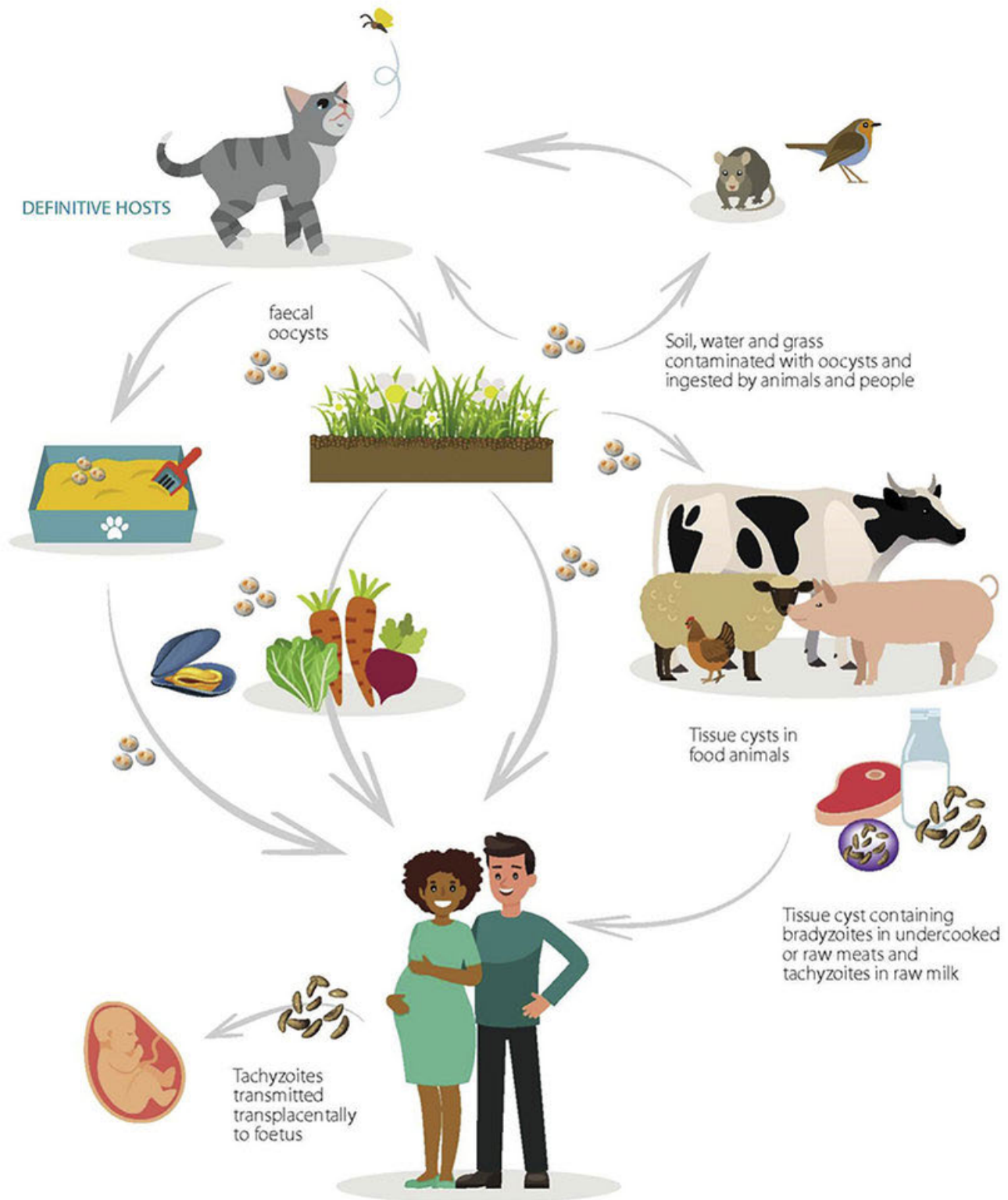
T. gondii is één van de meest voorkomende zoönotische parasieten ter wereld en vrijwel alle warmbloedige dieren, inclusief mensen, zoogdieren en vogels kunnen besmet worden door deze ziekteverwekker. *T. gondii* is de veroorzaker van toxoplasmose, een potentieel ernstige ziekte bij de mens die leidt tot een hoge humane ziektelast. Naar schatting is ongeveer een derde van de wereldbevolking geïnfecteerd met de parasiet (Tenter et al., 2000). Zwangere vrouwen en mensen met een verminderde immuniteit vormen de belangrijkste risicogroepen. Ook gezonde mensen kunnen geïnfecteerd worden, waarbij tijdelijke algemene ziekteverschijnselen als lymfklierzwellen en koorts kunnen voorkomen en terugkerende ontstekingen in het oog (chorioretinitis) tot ernstige gezichtsstoornissen kunnen leiden.

Levenscyclus *T. gondii* (zie figuur 1)

T. gondii heeft een complexe levenscyclus met verschillende infectieuze stadia en meerdere gastheren. Er zijn drie infectieuze stadia van *T. gondii*: 1. tachyzoïeten in de bloedbaan, 2. bradyzoïeten in weefselcysten en 3. sporozoïeten in oöcysten (Dubey, 1998). De kat is de enige eindgastheer van de parasiet en de kat heeft daarom de belangrijkste rol bij de overdracht van *T. gondii*. Katten kunnen zichzelf infecteren door opname van één van de drie infectieuze stadia van *T. gondii* (Dubey, 2010). Vervolgens kunnen ze miljoenen oöcysten via de ontlasting uitscheiden in het milieu (Dubey et al., 2010). Uitscheiding van oöcysten kan tot ongeveer 20 dagen aanhouden (Dubey, 2010). Oöcysten sporuleren binnen enkele dagen in het milieu en kunnen gedurende meer dan een jaar infectieus blijven in de bodem of het water. Een breed scala aan warmbloedige dieren kan geïnfecteerd raken door opname van gesporuleerde oöcysten uit besmette omgeving en kunnen dus dienen als tussengastheer van de parasiet (Dubey, 1998). Na opname van oöcysten door een tussengastheer (bijv mens of dier) worden sporozoïeten vrijgemaakt in de darm van deze tussengastheer. De sporozoïeten dringen de darmcellen in en worden daar omgezet in tachyzoïeten. Tachyzoïeten worden snel via de bloedstroom naar alle weefsels verspreid. In de weefsels worden weefselcysten gevormd met daarin tot wel 3000 bradyzoïeten per weefselcyste. Weefselcysten kunnen zich 7-10 dagen na infectie vormen en blijven leven in meerdere organen, het spierweefsel en de spieren van het centrale zenuwstelsel. Aangenomen wordt dat weefselcysten levensvatbaar blijven gedurende het leven van de gastheer. Als de kat een geïnfecteerde tussengastheer opneemt (bijvoorbeeld knaagdieren of vogels), is de cyclus van *T. gondii* voltooid. In tegenstelling tot de kat als eindgastheer scheiden tussengastheren *T. gondii* niet uit via de ontlasting, maar dierlijke

tussengastheren kunnen de infectie wel overdragen aan de mens door het eten van het vlees van die dieren.

FOODBORNE TRANSMISSION PATHWAYS FOR *TOXOPLASMA GONDII*



Figur 1: levenscyclus *Toxoplasma gondii*

Infectie routes - Milieu en vlees

Er zijn twee routes waarlangs *T. gondii* mensen kan infecteren. Dat is via het milieu, door bijvoorbeeld tuinieren of door het eten van rauwe groenten, besmet met oöcysten afkomstig uit de ontlasting van de kat. De andere route is via vlees, door het eten van rauw of onvoldoende verhit vlees of vleesproducten van geïnfecteerde dieren, besmet met weefselcysten. In Nederland wordt geschat dat 56% van de *T. gondii* infecties in de mens is toe te schrijven aan voedsel (o.a. vlees) en 36% aan contact met oöcysten in het milieu (o.a. water en grond) (Havelaar et al., 2008). Dit projectvoorstel is van toepassing op de risico's op *T. gondii* infecties in de mens via de vleesroute met als doel de voedselveiligheid te verbeteren.

Humane ziektelast van *T. gondii*

T. gondii wordt nationaal en internationaal erkend als een belangrijke voedselpathogeen, de humane ziektelast is hoog. Dit blijkt uit de resultaten van de volgende studies:

- Als tijdens de zwangerschap een infectie van de moeder met *T. gondii* optreedt, dan kunnen de tachyzoïeten de placenta passeren en het ongeborn kind infecteren. Dit leidt tot aangeboren toxoplasmose (Dunn et al., 1999). Het grootste deel van de ziektelast die gepaard gaat met infectie met *T. gondii* bij de mens is te wijten aan aangeboren toxoplasmose. In 2013 werd de jaarlijkse wereldwijde incidentie van aangeboren toxoplasmose geschat op 190.100 gevallen (1,5 per 1000 levendgeborenen), en de last van aangeboren toxoplasmose werd geschat op 1,2 miljoen DALY's (Torgerson en Mastroiacovo, 2013).
- In 2015 stond *T. gondii* op de vierde plaats van 24 door voedsel overgedragen parasieten wereldwijd (WHO, 2015).
- In de jaarlijkse vergelijking van de ziektelast van 14 voedseloverdraagbare ziekteverwekkers staat de ziektelast door congenitale en oog (oculaire) toxoplasmose in Nederland op de tweede plaats na *Campylobacter* (Lagerweij et al., 2020).
- In Europa, stond *T. gondii* op de tweede plaats van een ranglijst van 23 door voedsel overgedragen parasieten waarin rekening werd gehouden met de volksgezondheid, de handel en het sociaal economische belang (Bouwknegt et al., 2018).

Huidige strategieën voor preventie *T. gondii* risico's

Bovenstaande lijst geeft de impact van *T. gondii* op zowel nationale als internationale schaal duidelijk weer, daarom zijn in Nederland de volgende preventie strategieën van toepassing:

- Voorlichting van de risicogroepen (zwangere vrouwen en mensen met verminderde weerstand) wordt als belangrijk gezien. Bij deze voorlichting gaat het niet alleen om het vermijden van rauwe (rund)vleesproducten, maar ook om bijvoorbeeld hygiënemaatregelen bij het tuinieren. Verder geldt voor de algemene bevolking het advies vlees goed te verhitten.
- Voor (vlees)producten die doorgaans rauw gegeten worden zoals filet americain, geldt in het algemeen dat invriezen van het vlees waarmee de producten worden gemaakt een goede methode is om *T. gondii* te doden. Invriezen kent echter ook beperkingen. Het is in veel gevallen niet wenselijk vanwege overmatig vochtverlies, invriezen heeft een negatief effect op de kwaliteit (verkleuring) en levert bezwaren op bij afnemers (structuurverlies en hogere kosten). Verder kosten faciliteiten voor invriezen en ontdooien geld en energie. Bovendien zijn er voedselveiligheidsrisico's verbonden aan ontdooien van vlees. Wanneer het vlees niet gelijkmatig (alleen aan de buitenkant en niet in de kern) ontdooid dan kunnen er ongewenste bacteriën groeien in het vlees.
- De NVWA houdt bij producenten toezicht op de aanwezigheid van een voedselveiligheidsplan en controleert specifiek of *T. gondii* daarin is opgenomen als relevant gevaar.
- Andere preventieve benaderingen zijn het vergroten van de bioveiligheid bij het produceren van vlees. Maatregelen als bestrijding van knaagdieren, katten uit de buurt houden van boerderij / strooisel / opslag en zorgen voor schoon drinkwater op varkensbedrijven worden over het algemeen genomen voor dieren die binnen worden gehouden, maar deze maatregelen zijn onvoldoende voor dieren met buitenuitloop omdat *T. gondii* in het milieu voorkomt.
- Voor schapen is er een vaccin, dit wordt gebruikt om abortus als gevolg van *T. gondii* te voorkomen. Voor de overige landbouwhuisdieren is er geen vaccin.
- Er is geen commercieel verkrijgbaar vaccin voor gebruik bij katten en mensen. Bovendien, gebaseerd op wiskundige modellen is een hoge vaccinatiegraad voor katten nodig om het aantal menselijke infecties te verminderen. Een hoge dekking wordt als onhaalbaar beschouwd voor grote kattenpopulaties (Bonačić Marinović et al., 2019).

Samenvattend kan gezegd worden dat strategieën zijn ontwikkeld voor beheersing van *T. gondii* voedselveiligheidsrisico's. Echter, dit is nog niet effectief genoeg want de humane ziektelast voor *T.*

gondii is nog steeds hoog in Nederland en daarbuiten. Dit vraagt om een uitbreiding van de huidige preventieve maatregelen.

T. gondii risico's van rauwe vleeswaren

Uit onderzoek blijkt dat T. gondii voedselveiligheidsrisico's verbonden zijn aan het eten van vlees en met name van rauw gegeten vleeswaren.

- Uit een studie onder zwangere vrouwen in Europa bleek dat tussen 30% en 63% van de infecties konden worden toegeschreven aan consumptie van rauw of onvoldoende verhit vlees en vleesproducten (Cook et al., 2000).
 - Om het relatieve belang van de verschillende rauwe vleesproducten in kaart te brengen heeft het RIVM een QMRA-model (kwantitatieve microbiologische risicobeoordeling) ontwikkeld (Opsteegh et al. 2011). In dit model wordt op basis van het vóórkomen van T. gondii infectie bij de verschillende diersoorten, de afdoding door bereiding en de consumptiegegevens, voor ieder vleesproduct het aantal humane infecties voorspeld. Uit dit model blijkt dat 41% van de voorspelde infecties is toe te schrijven aan onverhitte vleesproducten (cervelaat, salami, filet américain, runderrookvlees, Suçuk droge Turkse worst, bacon, ontbijtspek, rauwe ham en theeworst). Doordat er slechts beperkt gegevens beschikbaar waren over de afdoding van T. gondii bij de bereiding van de vleesproducten zijn om die reden alleen de processtappen vriezen, verhitten en zouten opgenomen in het model. Het is zeer waarschijnlijk dat methodes als roken, zuren, fermenteren en het gebruik van andere additieven ook effect heeft op de levensvatbaarheid van T. gondii, en dus is het aantal voorspelde infecties voor bepaalde producten waarschijnlijk overschat.
 - In 2020 werd het QMRA model aangepast en opnieuw werd het relatieve belang uitgerekend (Deng et al., 2020). Resultaten tonen aan dat rundvlees de belangrijkste bron blijft, aangezien het 84% bijdroeg aan het totale aantal voorspelde besmettingen onder de Nederlandse bevolking, gevolgd door varkensvlees (12%), schapenvlees (3,7%), lamsvlees (0,2%) gemengd varkensvlees / rundvlees producten (0,1%) en kalfsvlees (0,01%). Op productniveau droeg alleen filet américain bij aan 80% van de totale voorspelde infecties in het basismodel, maar scenario analyses tonen aan dat de bijdrage ervan sterk afhankelijk is van de hoeveelheid zout die gebruikt wordt bij de bereiding van rauwe vleeswaren. Om die reden is het belangrijk dat de effecten van zouten en andere toevoegingen aan rauwe vleeswaren worden geëvalueerd.
- Samenvattend kan gezegd worden dat er T. gondii voedselveiligheidsrisico's zijn verbonden aan het eten van rauwe vleeswaren. Nader onderzoek is nodig naar de veiligheid van deze producten en met name is er antwoord nodig op de vraag of T. gondii afgedood in rauwe vleeswaren tijdens de bereiding of dat er een aanpassing van de receptuur nodig is.

Huidige mogelijkheden voor detectie van T. gondii parasieten

Voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag naar afdoding van T. gondii in rauwe vleeswaren tijdens de bereiding hiervan is een detectiemethode nodig. Deze methode moet in staat zijn om levende T. gondii parasieten aan te tonen. De meeste diagnostische testen (zoals serologie en PCR) maken geen verschil tussen dode en levende T. gondii parasieten. De bioassay in muizen is de enige methode waarmee dit wel kan. Hieronder wordt dit verder toegelicht.

- Detectie van T. gondii infecties met PCR: Voor diagnostiek van T. gondii infecties wordt een qPCR techniek gebruikt om het genetisch materiaal van de parasiet aan te tonen. De gevoeligheid van deze qPCR is soms te laag om weefselcysten aan te tonen in geïnfecteerde dieren. De reden hiervoor is dat het aantal weefselcysten laag kan zijn in geïnfecteerde dieren en daarom zijn er methodes ontworpen om een grotere hoeveelheid vleesmonster te testen, zodat de kans om een weefselcyste te vinden groter wordt. De magnetic-capture qPCR (MC-qPCR) is daar een voorbeeld van, hiermee kan één weefselcyste in 100 gram vlees worden aangetoond.
- Detectie van T. gondii infecties met serologie: Voor diagnostiek worden ook serologische testen gebruikt waarmee de antilichaamrespons tegen T. gondii (en niet de parasiet zelf) wordt aangetoond bij het dier. Uit onderzoek van Opsteegh et al., (2016) bleek dat voor varkens, kleine herkauwers en kippen serologie kan helpen om het risico voor de consument te bepalen, maar serologie is minder van waarde voor andere diersoorten zoals paarden en rundvee.
- Detectie van levende T. gondii met de muis bioassay: Met de PCR wordt T. gondii DNA aangetoond. Dit geeft echter geen indicatie over de aanwezigheid van levende T. gondii, er wordt slechts de aanwezigheid van genetisch materiaal van T. gondii aangetoond. Voor diagnostiek van T. gondii infecties is in het algemeen de PCR vaak voldoende. Echter, voor sommige vraagstellingen kan het van belang zijn om wél onderscheid te maken tussen levende en dode T. gondii. Bijvoorbeeld in studies (zoals deze) om het effect van zout op de levensvatbaarheid van T. gondii te

bepalen. In dat geval is een test nodig waarmee levende T. gondii kan worden aangetoond. Daar wordt de muisbioassay voor gebruikt. Dit is een internationaal aanvaarde gouden standaard voor het bepalen van de aanwezigheid van levend T. gondii. Voor het uitvoeren van de muisbioassay wordt het vlees (50-200 gram) in het laboratorium klein gesneden en met enzymen verteerd. Het weefseldigest (materiaal wat overblijft na vertering) wordt (intraperitoneaal of subcutaan) ingespoten in muizen. Na inoculatie worden de muizen gemonitord op klinische verschijnselen. Als de muizen ziek worden en doodgaan of geëuthanaseerd worden dan worden de hersenen of de buikvloeistof microscopisch of met de PCR onderzocht op T. gondii. Bloed wordt serologisch onderzocht op antilichamen. Op dit moment is de muisbioassay de enige methode waarmee onderzocht kan worden of vlees(producten) levende T. gondii bevatten of niet. Echter, de muisbioassay heeft als grootste beperking dat er levende muizen geïnoculeerd, ziek en doodgemaakt moeten worden voor de detectie. Vanuit ethisch oogpunt is dit detectiemodel ongeschikt om te gebruiken. Bovendien is deze assay duur en de uitvoerbaarheid complex. Samenvattend kan gezegd worden dat voor de onderzoeksvraag naar afdoding van T. gondii in rauwe vleeswaren tijdens de bereiding hiervan een detectiemethode nodig is. Deze methode moet in staat zijn om levende T. gondii parasieten aan te tonen. Zoals hierboven omschreven is de PCR hiervoor geen geschikte techniek en zou de muisbioassay nodig zijn. Echter, de muisbioassay is een dierproef en om ethische redenen ongewenst. Om afdoding van levende T. gondii te kunnen testen is er binnen dit project ruimte ingericht om een alternatieve proefdiervrije in vitro methode te ontwikkelen om de muisbioassay hiermee te kunnen vervangen.

Resultaten voorgaande studie

Deze aanvraag voor een projectvergunning is een vervolg op een eerdere projectvergunning. De titel van dat voorstel was "Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassay" (AVD5.1 lid2h). Het resultaat van dit werk is opgeschreven in een publicatie (Opsteegh et al., 2020). De resultaten van het eerste project zijn als basis gebruikt voor de strategie van dit vervolgproject.

De strategie van AVD5.1 lid2h bestond uit twee delen:

1. Eerst werden drie in vitro methoden voor detectie van levende T. gondii opgezet. Dit betroffen:

- celkweekmethode
- Real Time Viability (RTV) assay
- propidium monoazide-PCR (PMA-PCR).

Uit de resultaten bleek dat de PMA-methode onvoldoende specifiek was, ook dode T. gondii bleken toch nog detecteerbaar met deze PCR methode. De RTV-methode bleek niet geschikt om geïnfecteerd vlees mee te testen. De celkweekmethode bleek het meest geschikt te zijn.

2. Net als in dit project was één van de doelen om het muizenassay te vervangen door een in vitro methodiek. De gevoeligheid van de celkweekmethode en de muisbioassay werden met elkaar vergeleken. Daarnaast werd met beide methoden gekeken naar het effect van toevoegingen van zout, natriumlactaat en natriumacetaat op de levensvatbaarheid van T. gondii. Daarvoor werd (in grote lijnen) de werkwijze gevolgd om filet americain (één van de rauwe vleeswaren met een hoog risico op T. gondii) te maken in het laboratorium en bij de bereiding verschillende concentraties van zout, natriumacetaat en -lactaat te gebruiken.

Om het "filet-americain product" te maken werden herten van serologisch positieve schapen uit het slachthuis verzameld en dit vlees werd gemalen. Het hart is een voorkeursplaats voor een T. gondii infectie en de kans is dus het grootst op T. gondii positief weefsel als het hart gebruikt wordt. De herten afkomstig uit het slachthuis bleken onvoldoende bradyzoieten te bevatten om als model voor T. gondii geïnfecteerde vleeswaren gebruikt te worden.

In een tweede serie werden daarom extra T. gondii weefselcysten aan de herten toegevoegd. Met behulp van celkweek waren de effecten van de toevoegingen van zout, natriumacetaat en natriumlactaat in dit experiment niet te beoordelen, maar in de muisbioassay (in 58 muizen) bleek een grote maar onvolledige vermindering van het aantal geïnfecteerde muizen. Geen van de geteste combinatie van zout, natriumlactaat en natriumacetaat leidde tot een 100% afdoding. Zout bleek het meeste effect te hebben op de levensvatbaarheid van T. gondii.

Samenvattend kunnen de conclusies van dit project als volgt geduid worden:

- Uit de resultaten van de muisbioassay blijkt dat geen enkele geteste combinatie van zout, natriumlactaat en natriumacetaat tot een 100% afdoding leidde. Zout bleek de belangrijkste component voor afdoding van *T. gondii*. Verder testen en verdere optimalisaties zijn nodig om te bepalen bij welke concentraties van zout en andere additieven *T. gondii* wordt geïnactiveerd en de vleeswaren veiliger worden.
- Het hartweefsel van schapen uit het slachthuis bleek onvoldoende geschikt omdat het aantal weefselcysten te laag was en niet homogeen genoeg verdeeld was over het vlees. Slechts een deel van de serologisch positieve schapen was ook positief in de PCR. Extra spiking (toevoegen) met weefselcysten bleek nodig.
- De resultaten van de celkweek zijn hoopgevend voor de ontwikkeling van een alternatief voor de muisbioassay. Echter, verdere optimalisatie van de celkweekmethode is nog nodig voordat deze toegepast kan worden in de praktijk.

Literatuurlijst

- Bouwknegt, M.; Devleeschauwer, B.; Graham, H.; Robertson, L.; Giessen, J.; Lassen, B. Prioritisation of food-Borne Parasites in Europe, 2016. *Eurosurveillance* 2018, 23, doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.9.17-00161.
- Cook, A.J., Gilbert, R.E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P.A., Foulon, W., Semprini, A.E., Dunn, D.T. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *European Research Network on Congenital Toxoplasmosis*. 2000 *Bmj* 321, 142-147.
- Deng H, Swart A, Bonačić Marinović AA, van der Giessen JWB, Opsteegh M. The effect of salting on *Toxoplasma gondii* viability evaluated and implemented in a quantitative risk assessment of meatborne human infection. *Int J Food Microbiol*. 2020 Feb 2;314:108380. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108380. Epub 2019 Oct 30. PMID: 31707174.
- Dunn, D., Wallon, M., Peyron, F., Petersen, E., Peckham, C., Gilbert, R., 1999, Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet* 353, 1829-1833.
- Dubey, J.P., 2010. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. Second edition. CRC Press; 2010 313 pages. ISBN 978-1-4200-9236-3.
- Mercedes Gomez-Samblas, Susana Vilchez, Rocío Ortega-Velázquez, Màrius V. Fuentes, Antonio Osuna, Absence of *Toxoplasma gondii* in 100% Iberian products from experimentally infected pigs cured following a specific traditional process, *Food Microbiology*, Volume 95, 2021, 103665, ISSN 0740-0020, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103665>.
- Gezondheidsraad. Richtlijnen goede voeding 2015. Publicatienr. 2015/24. Den Haag.
- Havelaar AH, Galindo AV, Kurowicka D, Cooke RM. Attribution of foodborne pathogens using structured expert elicitation. *Foodborne Pathog Dis*. 2008 Oct;5(5):649-59. doi: 10.1089/fpd.2008.0115. PMID: 18687052.
- Guo M, Mishra A, Buchanan RL, Dubey JP, Hill DE, Gamble HR, Jones JL, Du X, Pradhan AK. Development of Dose-Response Models to Predict the Relationship for Human *Toxoplasma gondii* Infection Associated with Meat Consumption. *Risk Anal*. 2016 May;36(5):926-38. doi: 10.1111/risa.12500. Epub 2015 Oct 19. PMID: 26477997
- Havelaar, A.H., Kirk, M.D., Torgerson, P.R., Gibb, H.J., Hald, T., Lake, R.J., Praet, N., Bellinger, D.C., de Silva, N.R., Gargouri, N., Speybroeck, N., Cawthorne, A., Mathers, C., Stein, C., Angulo, F.J., Devleeschauwer, B., 2015. World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. *PLoS Med* 12, e1001923.
- Havelaar, A H, Haagsma, J A, Mangen, M J, Kemmeren, J M, Verhoef, L P, Vijgen, S M, Wilson, M, Friesema, I H, Kortbeek, L M, van Duynhoven, Y T, van Pelt, W, 2012. Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009. *Int. J. Food Microbiol*. 156, 231-238.
- Kijlstra A, Eissen OA, Cornelissen J, Munniksma K, Eijck I, Kortbeek T. *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Sep;45(9):3165-9. doi: 10.1167/iovs.04-0326. PMID: 15326136.
- Lagerweij, G.R., Pijnacker, R., Friesema, I.H.M., Mughini Gras, L. and Franz, E. Disease burden of food-related pathogens in the Netherlands, 2019, RIVM letter report 2020-0117.
- Lindsay DS, Kaur T, Mitchell SM, Goodwin DG, Strobl J, Dubey JP. Buprenorphine does not affect acute murine toxoplasmosis and is recommended as an analgesic in *Toxoplasma gondii* studies in mice. *J Parasitol*. 2005 Dec;91(6):1488-90. doi: 10.1645/GE-732R.1. PMID: 16544426.
- Opsteegh, M, Teunis, P, Mensink, M, Zuchner, L, Titilincu, A, Langelaar, M, Van der Giessen, J, 2010. Evaluation of ELISA test characteristics and estimation of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in Dutch sheep using mixture models. *Prev. Vet. Med*. 96, 232-240

- Opsteegh, M., Prickaerts, S., Frankena, K., Evers, E.G., 2011. A quantitative microbial risk assessment for meatborne *Toxoplasma gondii* infection in The Netherlands. *International journal of food microbiology* 150, 103-114.
- Opsteegh M, Dam-Deisz C, de Boer P, DeCraeye S, Faré A, Hengeveld P, Luiten R, Schares G, van Solt-Smiths C, Verhaegen B, Verkleij T, van der Giessen J, Wisselink HJ. Methods to assess the effect of meat processing on viability of *Toxoplasma gondii*: towards replacement of mouse bioassay by in vitro testing. 2020 doi: 10.1016/j.ijpara.2020.04.001
- Tenter AM, Heckerroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000;30:1217-58.
- Torgerson PR, Mastroiacovo P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bull World Health Organ.* 2013 Jul 1;91(7):501-8. doi: 10.2471/BLT.12.111732. Epub 2013 May 3. PMID: 23825877; PMCID: PMC3699792.
- World Health Organization (WHO) Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases 2015.

3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

Hoofddoelstellingen

1. Het vergroten van de voedselveiligheid door beheersing van *T. gondii* risico's in rauwe vleeswaren. Dit doel wordt bereikt door het effect van huidige procesmaatregelen (o.a. het toevoegen van zout) op de bereiding van rauwe vleeswaren te bepalen en zo nodig verder te optimaliseren.
2. De traditionele muisbioassay wordt vervangen door een proefdiervrij alternatief, namelijk de celkweek methode, zodat procesmaatregelen voor de bereiding van vleeswaren in het laboratorium getest kunnen worden en dit niet meer hoeft in een dier.

Subdoelstellingen

1. Optimaliseren van de celkweek
2. Een diermodel opzetten om onder experimentele omstandigheden voldoende *T. gondii* besmet weefsel te verkrijgen.
3. Met het verkregen *T. gondii* vlees nagaan welke concentraties van zout en andere additieven *T. gondii* inactiveren en daarmee de vleeswaren veiliger maken. Deze tests worden in eerste instantie uitgevoerd met behulp van de celkweek.
4. Confirmatie van de resultaten verkregen met de celkweek (subdoel 3) met de muisbioassay. De muisbioassay is de 'gouden standaard'. De resultaten van afdoding van *T. gondii* door procesmaatregelen zal getest worden in de celkweek en vergeleken worden met de muisbioassay.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

Samenwerkingspartners

Dit project is een PPS (publiek private samenwerking) waarbij samengewerkt wordt tussen het bedrijfsleven en onderzoeksinstituten. De overheid financiert 50% van de kosten van dit onderzoek. Vanwege het belang van dit onderzoek voor de voedselveiligheid nemen deel en dragen financieel bij partijen uit de Nederlandse vleesverwerkende industrie. Dat betreft twee vertegenwoordigende organisaties: Koninklijke Nederlandse Slagers (KNS) en de Vereniging voor de Nederlandse Vleeswarenindustrie (VNV) en vier verschillende producenten van vleeswaren (J. F. Luiten Vleeswaren, Ladessa, Group of Butchers, Slagerij Woorts). Daarnaast nemen vier onderzoeksinstituten deel: 5.1 lid2h RIVM en TNO. Het is dus een studie voor en samen met de Nederlandse vleeswarenindustrie. De resultaten zullen gebruikt worden door de vleeswarenindustrie. In de afgelopen jaren heeft de Nederlandse overheid (Ministerie van VWS) vragen gesteld aan de vleeswarenssector over de preventie van *T. gondii* risico's in rauwe vleeswaren. Dit was voor de sector mede aanleiding om het bovengenoemde PPS project te starten. Het plan voor dit project is

bekend gemaakt aan de overheid en de vleeswarenssector zal de resultaten terug te koppelen naar de overheid.

Kennis en expertise

- RIVM is het kennis- en expertisecentrum van T. gondii infecties, dit betreft T. gondii infecties in mensen en in dieren. De kennis en expertise is inclusief ontwikkeling en toepassing van diagnostische testen voor T. gondii. Voor dit project vindt de ontwikkeling en de optimalisatie van de celkweek plaats bij het RIVM. Er is ruime ervaring bij het RIVM met de celkweek van T. gondii tachyzoieten en tijdens het vorige project is er ervaring opgedaan met de celkweek van bradyzoieten.
- **5.1 lid2h** heeft ook veel kennis en expertise op het gebied van T. gondii. Daarnaast heeft **5.1 lid2h** de faciliteiten en kennis voor de uitvoering van dierproeven, ook met de muisbioassay voor T. gondii studies. De uitvoering van de dierproeven zal plaatsvinden bij **5.1 lid2h**
- **5.1 lid2h** en TNO brengen vleestechnologische en microbiologische kennis en ervaring in om vleeswaren te kunnen produceren. Dit is inclusief kennis van vleeswaren die rauw geconsumeerd kunnen worden.
- Detailinformatie en kennis over de bereiding en recepturen van de rauwe vleeswaren is beschikbaar bij de vleeswarenbedrijven die betrokken zijn bij dit project.

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project? No Yes > Describe which laws and regulations apply and describe the effect on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

3.3 Relevance

3.3.1 What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

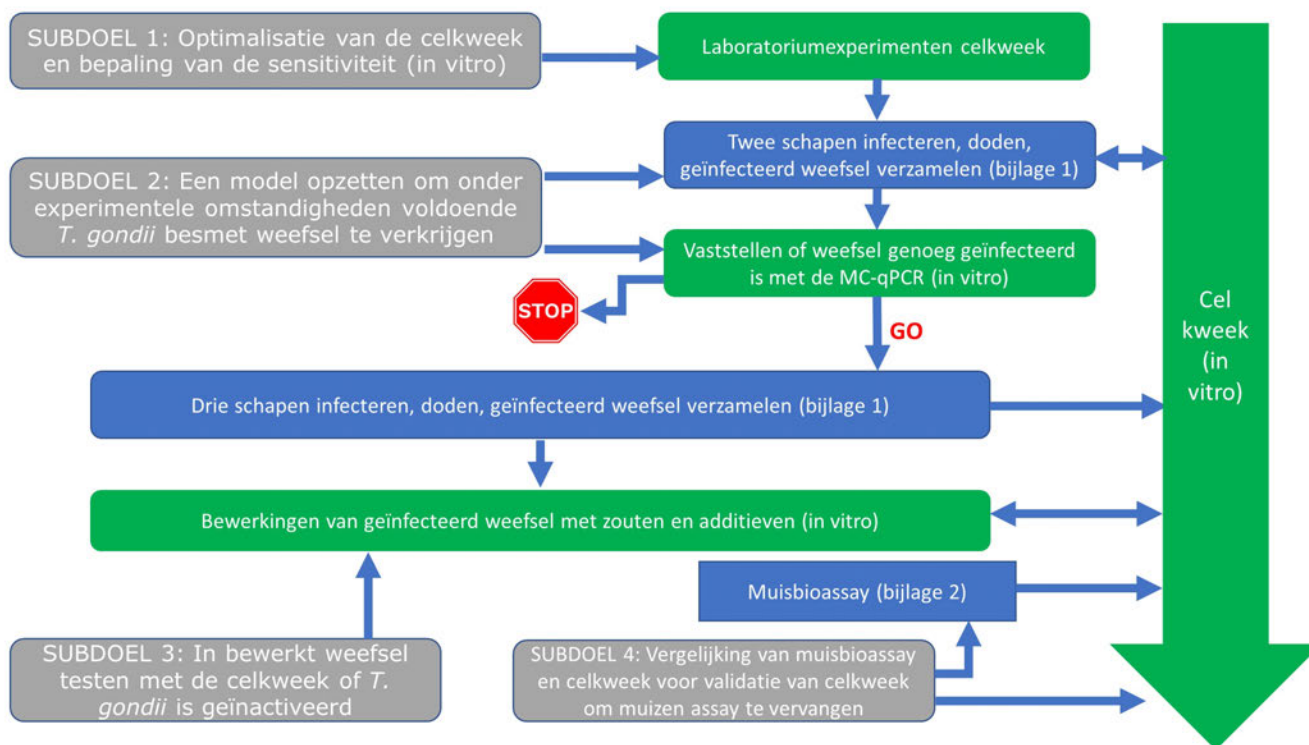
- T. gondii wordt nationaal en internationaal erkend als een belangrijke voedselpathogeen (zie sectie 3.1). De hoge humane ziektelast maakt het noodzakelijk dat er maatregelen worden genomen om T. gondii infecties te voorkomen.
- Ook wordt breed erkend dat beheersing van T. gondii risico's van rauw geconsumeerde vleesproducten gewenst is (zie ook sectie 3.1)
- Voor de vleeswarenssector is het urgent en belangrijk om te weten of de huidige procesmaatregelen voor de bereiding van rauwe vleeswaren, eventueel met kleine aanpassingen van de receptuur, voldoende zijn om het risico voor de consument te beheersen.
- De overheid neemt maatregelen om de veehouderij diervriendelijker en duurzamer te maken. Verduurzamen van de veehouderij betekent waarschijnlijk ruimte voor het natuurlijke gedrag van koeien, varkens en kippen en zorg voor hun specifieke behoeften en daarmee wordt buitenloop gestimuleerd. Meer buitenloop van dieren betekent meer risico op een T. gondii besmetting. T. gondii oöcysten komen voor in het milieu en bijvoorbeeld in de biologische varkenshouderij hebben varkens de mogelijkheid om buiten te lopen. Juist bij deze varkens komen meer T. gondii infecties voor (Kijlstra et al., 2004).
- Er is al meerdere jaren extra aandacht voor de hoeveelheid zout in voedingsmiddelen. De Gezondheidsraad beveelt aan om het gebruik in Nederland te beperken ter voorkoming of terugdringing van een hoge bloeddruk en ter vermindering van de kans op hart- en vaatziekten (Gezondheidsraad, 2015). Nederlandse vleeswarenproducenten werken aan het verder terugdringen van de zoutgehalten in hun producten. Dit project is van waarde voor de vleeswarenindustrie omdat duidelijk wordt hoeveel zout er nodig is om T. gondii in rauwe vleeswaren af te doden. De verworven kennis van dit project kan gebruikt worden om onder- of overdosering te voorkomen.
- Het risico van T. gondii in rauwe vleeswaren heeft de aandacht van de Nederlandse overheid, deze heeft vragen gesteld aan de vleeswarenssector over de preventie van T. gondii risico's in rauwe vleeswaren.
- De ontwikkeling van een in vitro methode als vervanging van de muisbioassay is voorwaardenscheppend voor de hoofddoelstelling, namelijk zorgen dat rauw geconsumeerde vleeswaren veiliger worden.
- De evaluatie van procesmaatregelen voor beheersing van T. gondii risico's in rauw gegeten vleeswaren en eventueel het aanpassen hiervan.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

- De vleeswarenssector (1): Het belang is om veilig voedsel van hoge kwaliteit te produceren.
- De vleeswarenssector (2): Producenten van rauwe vleesproducten hebben de verantwoordelijkheid om T. gondii voedselveiligheidsrisico's van rauwe vleeswaren te beheersen. Een belangrijk onderdeel van het verder bevorderen van de voedselveiligheid voor hen is een rekenmodel waaruit afgeleid kan worden welke procesmaatregelen effectief zijn voor het afdoden van T. gondii bij de bereiding van rauwe vleeswaren.
- Proefdieren: De ontwikkeling van de celkweek als alternatief voor de muisbioassay om levende T. gondii parasieten aan te tonen maakt het mogelijk voor de producenten om aanvullende testen uit te kunnen laten voeren zonder dat de muisbioassay nog nodig is.
- Landbouwhuisdieren: Beheersing van T. gondii risico's in de vleesproductieketen is op twee manieren mogelijk: 1) door de buitenloop van deze dieren te beperken en 2) door te zorgen voor een T. gondii veilige productie van vleeswaren. Vanuit dierenwelzijnsbelangen is beheersing van T. gondii risico's bij de productie van vleeswaren te prefereren.
- De wetenschap (1): Het belang is dat er nieuwe inzichten worden verworven over het beheersen van T. gondii risico's in rauwe vleeswaren.
- De wetenschap (2): Het belang is dat er een alternatieve test voor de muisbioassay ter beschikking komt. Dat de ontwikkeling van alternatieven voor de muisbioassay steeds meer urgent wordt blijkt bijvoorbeeld uit het sluiten van de kat assay faciliteit bij de USDA (<https://www.usda.gov/media/pressreleases/2019/04/02/ars-announcetoxoplasmosis-research-review-discontinues-research>).
- De wetenschap (3): Het belang is dat de resultaten van deze studie als input gebruikt kunnen worden voor de QMRA, die bij het RIVM is ontwikkeld. Op die manier kan opnieuw worden bepaald welke producten de grootste bijdrage leveren aan infecties in de bevolking.
- De consument: Het belang is veilig voedsel van hoge kwaliteit.
- De maatschappij (1): Het belang is vermindering van de ziektelast en kosten in de gezondheidszorg ten gevolge van T. gondii infecties.
- De maatschappij (2): Het belang is dat er een proefdiervrij alternatief voor de muisbioassay ter beschikking komt, wat vanuit ethisch oogpunt gewenst is.
- De overheid (1): Het belang is dat zij haar verantwoordelijk na kan komen om te zorgen voor voedselveiligheid.
- De overheid (2): De kennis die is opgedaan in dit project kan de overheid gebruiken om preventiestrategieën te bepalen.

3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.



Beschrijving subdoelen

- Onder 3.2.1 zijn 4 subdoelen beschreven. Hieronder worden ze verder uitgewerkt.
- Bij ieder subdoel zijn milestones (voorziene resultaten) beschreven. Deze milestones zijn nodig om het volgende onderdeel uit te kunnen voeren en de milestones dienen daarom behaald te worden voordat gestart kan worden met het volgende onderdeel.
- Alleen bij subdoel 2 is een go-nogo opgenomen. Bij dit subdoel is dit alleen relevant, bij de overige niet.

Subdoel 1: Optimalisatie van de celkweek en bepaling van de sensitiviteit (in vitro)

- In dit onderdeel wordt de celkweekmethode op de verschillende groeistadia van *T. gondii* (tachyzoieten, bradyzoieten) geoptimaliseerd en wordt de detectielimiet bepaald van de celkweek op tachyzoieten en bradyzoieten. Deze experimenten worden uitgevoerd met vlees van *T. gondii* negatieve dieren waar tachyzoieten of bradyzoieten aan toe worden gevoegd. Hiervoor zijn geen dierexperimenten noodzakelijk.
- Voor de uitvoer van dit onderdeel wordt gebruik gemaakt van de ervaring die is opgedaan in het eerste project. Toen bleek dat vooral schimmelvorming in de celkweek een probleem was. In dit in vitro onderdeel wordt getest hoe dit voorkomen kan worden. Ook zal nagegaan worden welk enzym het beste gebruikt kan worden voor digestie (vertering) van vlees.
- In dit in vitro deel wordt zowel de celkweek met tachyzoieten als met bradyzoieten uitgevoerd. De kweek met bradyzoieten is vooral relevant omdat dit het infectiestadium is van de parasiet die aangetoond dient te worden in vlees van de dieren. De kweek met tachyzoieten wordt uitgevoerd omdat er al veel ervaring is met de celkweek van dit infectiestadium.

Milestones:

- Een protocol voor digestie (vertering) van vlees
- Geoptimaliseerde protocollen voor celkweek van tachyzoieten en bradyzoieten
- Bepaling van sensitiviteit (detectielimiet) van de celkweek op tachyzoieten en bradyzoieten in gespiked vlees

Subdoel 2: Een diermodel opzetten om onder experimentele omstandigheden voldoende *T. gondii* besmet weefsel te verkrijgen.

- Ervaring met het slachthuismateriaal was dat er onvoldoende betrouwbaar positieve schapen konden worden verkregen en dat de concentratie van weefselcysten te laag was voor de experimenten met de procesmaatregelen.
- De verwachting is dat de concentratie weefselcysten in experimenteel geïnfecteerde schapen

hoger is, in een experimentele studie is de infectiegraad beter te sturen en dat maakt de kans op succes groter.

- In de literatuur (Dubey, 2009) wordt vermeld dat de kans erg groot is dat een infectie aanslaat maar hoe hoog de concentratie is van T. gondii in het vlees en welke weefsels positief worden en vervolgens of dit voldoende is voor het uitvoeren van de experimenten met procesmaatregelen is niet duidelijk.
 - Om die reden zullen twee schapen geïnfecteerd worden met T. gondii en zal bepaald worden met de MC-qPCR welke weefsels (hart, middenrif en meerdere spierweefsels) positief zijn. Vervolgens zal met de celkweek nagegaan worden wat de gevoeligheid is van de celkweek op dit materiaal. Om dit te bepalen zullen de resultaten van de MC-qPCR en de weefselkweek met elkaar vergeleken worden. Ook zal de qPCR uitgevoerd worden op digest wat in de weefselkweek gebruikt wordt om een goede indicatie te krijgen van de sensitiviteit van de celkweek.
 - De infectie in de beide schapen zal serologisch vervolgd worden, daarvoor zullen bloedmonsters genomen worden van de schapen en getest worden op antilichamen tegen T. gondii. Een positieve serologie duidt op een succesvolle infectie. Alleen vlees van serologisch positieve schapen kan gebruikt worden voor uitvoeren van de verschillende procesmaatregelen.
 - Na 10 weken zal euthanasie van de schapen plaatsvinden in de sectiezaal van 5.1 lid2h Het hart, middenrif en spiervlees zal worden klaargemaakt voor de experimenten in het laboratorium. Milestones: Uitvoering van MC-qPCR op hart, middenrif en spiervlees en bepaling sensitiviteit van de celkweek.
- GO: MC-qPCR is positief op één of meerdere weefsels.
NO-GO: MC-qPCR is negatief op alle onderzochte weefsels.

Subdoel 3: Met het verkregen T. gondii weefsel nagaan welke concentraties van zout en andere additieven T. gondii inactiveren en daarmee de vleeswaren veiliger maken. Deze tests worden alleen uitgevoerd met behulp van de celkweek.

- In overleg met de producenten van vleeswaren zijn 16 procesmaatregelen opgesteld die getest zullen worden op afdoding van T. gondii in de celkweek. Deze bevatten een reeks aan NaCl concentraties, en toevoeging van natriumlactaat en natriumacetaat bij een vaste concentratie NaCl (zie voor details 3.4.2). De gekozen combinaties komen overeen met de recepturen van de producenten van vleeswaren. De resultaten van het onderzoek zijn dus in de praktijk toepasbaar.
 - Deze experimenten vinden dus alleen plaats met de celkweek en nog niet in de muisbioassay.
 - De resultaten van de celkweek geëvalueerd worden en er zal besloten worden welke procesmaatregelen voldoende aanknopingspunten bieden om de verkregen resultaten te confirmeren in de muisbioassay. Maatregelen die met behulp van de celkweek niet effectief blijken hoeven niet in de muisbioassay bevestigd te worden, hiermee worden worden muizen bespaard.
- Milestones:
- Effect procesmaatregelen op de afdoding van bradyzoieten met behulp van celkweek.
 - Lijst met procesmaatregelen die geconfirmeerd zullen worden in de muisbioassay.

Subdoel 4: Confirmatie van de resultaten verkregen met de celkweek (subdoel 3) met de muisbioassay. De muisbioassay is de 'gouden standaard'. De resultaten van afdoding van T. gondii door procesmaatregelen zal getest worden in de celkweek en vergeleken worden met de muisbioassay.

- In dit onderdeel wordt de bepaling van de detectielimiet van de celkweek herhaald (zie subdoel 3) en vergeleken met de detectielimiet in de muisbioassay.
- Ook zal er een confirmatie plaatsvinden van de bevindingen van subdoel 3, als validatie van de resultaten van de celkweek. De resultaten van afdoding van T. gondii door procesmaatregelen zal getest worden in de celkweek en vergeleken worden met de muisbioassay.

Milestones:

- Op basis van de vergelijking van de detectielimiet zullen conclusies getrokken worden over de mogelijkheden om de muisbioassay te vervangen door de celkweek.
- Voor de verschillende procesmaatregelen worden de resultaten uit celkweek en muisbioassay gebruikt om een conclusie te trekken wat betreft effectiviteit van afdoding.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

Natuurlijk geïnfecteerd T. gondii positief schapenvlees

- In paragraaf 3.1 wordt beschreven hoe in het voorgaande project AVD5.1 lid2h geïnfecteerd weefsel is verkregen, namelijk door middel van slachthuis materiaal (schapen harten).

- Het doel in het voorgaande project was om vlees van natuurlijk T. gondii geïnfecteerde dieren te gebruiken. De voorkeur ging daarbij uit naar rundvlees (omdat filet americain hiervan gemaakt wordt), echter het aantal levende T. gondii infecties in rund is erg laag en daarom is het niet mogelijk om T. gondii geïnfecteerd rundvlees te verkrijgen.
- Schapen werden geselecteerd omdat bekend is dat de seroprevalentie bij schapen hoog is (Opsteegh et al., 2010) en dat er een goede overeenstemming is tussen de detectie van antilichamen en de aanwezigheid van T. gondii. Bovendien is het hart geïdentificeerd als voorkeursplaats (Opsteegh et al., 2016).
- Helaas bleek tijdens de uitvoering van de experimenten de hoeveelheid geïnfecteerd vlees laag en er was extra spiking (toevoeging) met weefselcysten nodig.
- Redenen voor het beperkte aantal positieve schapen zijn dat de concentratie van weefselcysten bij positieve dieren te laag was en dat de verdeling van weefselcysten over het vlees niet homogeen was.

Experimenteel geïnfecteerd T. gondii positief schapenvlees

- Voor dit vervolgproject is de vervangende strategie om schapen experimenteel te infecteren met T. gondii.
- Door dit te doen is de verwachting dat deze dieren een meer betrouwbare bron van T. gondii positief vlees zijn dan harten van schapen uit het slachthuis.
- Dit omdat van schapen die experimenteel geïnfecteerd zijn met T. gondii het zeker is dat er een infectie heeft plaatsgevonden en er van de positieve dieren naast het hart veel spiermateriaal beschikbaar is.
- Van harten uit het slachthuis is niet bekend of het schaap geïnfecteerd was met T. gondii en hoe hoog de concentratie van bradyzoieten was. Deze concentratie kan variëren van laag naar hoog.
- Met een experimentele infectie daarentegen kan gemikt worden op een hoge concentratie weefselcysten in het vlees van het schaap. Dit kan door een relatief hoge infectiedosis te gebruiken. In Opsteegh et al., 2016 worden challenge experimenten beschreven in schapen met 5×10^5 oöcysten. Deze relatief hoge challenge dosis werd succesvol gebruikt om de verspreiding van T. gondii naar zoveel mogelijk weefsels te realiseren. Esteban-Redondo et al., (1999) vond vaker T. gondii in schapen geïnfecteerd met een dosis van 5×10^5 dan in schapen geïnfecteerd met 5×10^3 oöcysten.
- Een hogere dosis leidt niet tot meer klinische symptomen na infectie. Benavides et al., 2011 gebruikte 5×10^3 en 5×10^5 oöcysten om schapen te infecteren en had de ervaring dat bij beide challenge doses er alleen een temperatuurverhoging werd gemeten gedurende enkele dagen.
- Er worden dus meer weefselcysten gevonden bij een hogere dosis en een hogere dosis geeft geen aanleiding tot een hogere ziektelast voor het schaap.

Challenge periode

Uit gegevens in de literatuur blijkt dat na infectie met T. gondii schapen 6 weken of langer (12 weken, 6 maanden) aangehouden voordat euthanasie plaatsvindt (Dubey et al., 2009; Esteban-Redondo 1999). Uit onderzoek van weefsels van de schapen op 6 weken of 6 maanden na infectie bleek geen verschil in de verspreiding van T. gondii (Esteban-Redondo et al., 1999).

Schapen of varkens infecteren

Uit de literatuur blijkt dat ook varkens experimenteel geïnfecteerd kunnen worden om T. gondii positief vlees te verkrijgen. Net als schapen ontwikkelen varkens beperkte klinische symptomen en bij beide behoort een orale infectie met oöcysten tot de natuurlijke mogelijkheden voor een T. gondii infectie (Dubey, 2010). De voorkeur gaat echter uit naar schapen vanwege de opgedane ervaringen in het eerste project.

De celkweekmethode uitgelegd

T. gondii is een intracellulaire parasiet en voor de kweek in het laboratorium zijn cellen nodig voor de groei van T. gondii. Voor dit project worden RK13 en Vero cellen gebruikt. Beide cellijnen komen oorspronkelijk uit dieren, maar worden proefdiervrij uit de stikstofcollectie opgekweekt en vermeerderd.

In een celkweek worden cellen in het laboratorium opgekweekt: deze cellen worden in een kweekschaal gebracht in een vloeibaar groeimedium. De cellen gaan zich vermenigvuldigen en vormen een monolayer (een laag) van cellen op de bodem van de kweekschaal. De beoordeling van

de groei van de cellen in de celkweek gebeurt met de microscoop. Wanneer de monolayer ongeveer de hele fles bedekt worden tachyzoiten, bradyzoiten of het digest van geïnfecteerd vlees opgebracht. De tachyzoiten of bradyzoiten dringen de cellen binnen en vermenigvuldigen zich intracellulair tot zij de cel verlaten en volgende cellen infecteren. Groei van *T. gondii* kan waargenomen worden doordat de cellen doodgaan. Het doodgaan van de cellen duidt er op dat er beschadigingen zijn, dat heeft dus een soort signaalfunctie dat er iets met de cellen aan de hand is. Uitleesparameter voor de groei is een qPCR (quantative PCR). Hiermee kan kwantitatief de hoeveelheid *T. gondii* DNA bepaald worden in een monster. Gedurende drie weken, wordt iedere week een deel van het kweekmedium weggenomen en wordt bepaald hoeveel *T. gondii* DNA aanwezig is. Groei van tachyzoieten of bradyzoieten in een weefselkweek wordt gekenmerkt door een toename van *T. gondii* DNA in het kweekmedium in de loop van de tijd. Dat kan dus worden afgelezen uit de resultaten van de qPCR.

Lijst met procesmaatregelen

In overleg met de producenten van vleeswaren zijn 16 procesmaatregelen opgesteld die getest zullen worden op afdoding van *T. gondii* in de celkweek. Deze bevatten een reeks aan NaCl concentraties, en toevoeging van natriumlactaat en natriumacetaat bij een vaste concentratie NaCl (zie figuur hieronder). De zoutconcentraties zijn zodanig gekozen dat ze de belangrijkste recepturen van de vier bij dit project betrokken producenten van vleeswaren omvatten. Tijdstechisch gezien kan er één serie gebeuren op een dag. Voor het uitvoeren van de testen zijn er per serie 4 controles nodig, totaal 8.

	Serie 1		Serie 2
D1	Negatief	D13	Negatief
D2	Negatief + weefselcysten	D14	Negatief + weefselcysten
D3	Positief onbehandeld	D15	Positief onbehandeld
D4	Positief onbehandeld	D16	Positief onbehandeld
D5	0.9% NaCl	D17	1.2% NaCl + 1.2% lac
D6	1.2% NaCl	D18	1.2% NaCl + 1.2% lac
D7	1.5% NaCl	D19	1.2% NaCl + 2% lac
D8	1.8% NaCl	D20	1.2% NaCl + 2% lac
D9	2.1% NaCl	D21	1.2% NaCl + 1.2% lac + 0.4% ac
D10	2.4% NaCl	D22	1.2% NaCl + 1.2% lac + 0.4% ac
D11	2.7% NaCl	D23	1.2% NaCl
D12	3.0% NaCl	D24	1.2% NaCl

3.4.3 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	Toxoplasma gondii infectie van schapen
2	Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028)

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	5.1 lid2h	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	5.1 lid2h	
1.3	List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Toxoplasma gondii infectie van schapen

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Doel en algemene opzet van deze dierproef

Doel van deze dierproef is om *Toxoplasma gondii* positief schapenvlees te verkrijgen. De eerste stap is om vast te stellen of dit model voldoende *T. gondii* positief vlees oplevert. Als dit vastgesteld is dan zal dit positieve vlees gebruikt worden om de celweek te valideren. Verder ook om de huidige procesmaatregelen voor de bereiding van rauwe vleeswaren te evalueren en indien nodig aan te passen.

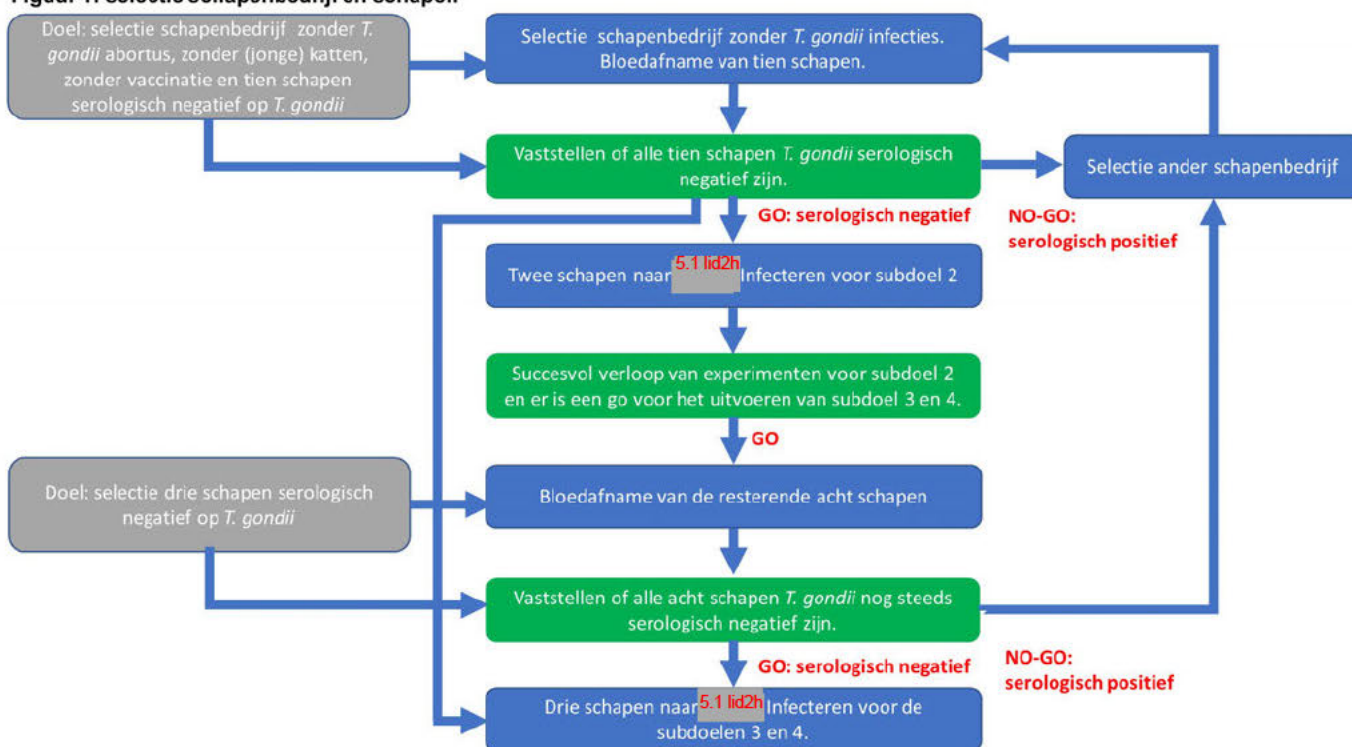
Samengevat wordt positief besmet vlees verkregen voor de volgende 3 subdoelstellingen (zie project proposal paragraaf 3.2.1):

- Subdoel 2: Gebruik van een diermodel (uit de literatuur) om onder experimentele omstandigheden voldoende *T. gondii* besmet weefsel te verkrijgen.
- Subdoel 3: Bewerkt weefsel testen met de celweek om te bepalen of *T. gondii* is geïnactiveerd.
- Subdoel 4: Vergelijking van muisbioassay en celweek voor validatie van celweek om de muisbioassay te vervangen.

Selectie schapenbedrijf en schapen

In figuur 1 staat hoe de werkwijze zal zijn om een schapenbedrijf met een laag *T. gondii* risico te selecteren en om *T. gondii* serologisch negatieve schapen te verkrijgen. Geschikte schapen zullen worden verkregen op twee verschillende momenten: 1) twee schapen voor subdoel 2 en 2) drie schapen voor de subdoelen 3 en 4.

Figuur 1: selectie schapenbedrijf en schapen



T. gondii positief schapenvlees

- Voor het verkrijgen van *T. gondii*-positief vlees zullen schapen experimenteel (oraal) worden geïnfecteerd met *T. gondii* oöcysten. Oöcysten zijn gekozen om mee te infecteren omdat natuurlijke infecties van schapen ook oraal plaatsvinden met oöcysten. Op deze wijze wordt een natuurlijke infectie dicht benaderd. 10 weken na infectie worden de dieren geëuthanaseerd om het geïnfecteerde weefsel te verkrijgen.
- In figuur 2 staat de algemene opzet van de experimentele infectie in subdoel 2.
- In figuur 3 staat de algemene opzet van de experimentele infectie in de subdoelen 3 en 4.

Selectie schapenbedrijf en schapen

- Selectie van een schapenbedrijf met een laag risico voor *T. gondii* infecties door uitvragen van de abortushistorie, vaststellen of er *T. gondii* vaccinatie wordt toegepast, afwezigheid van (jonge) katten op het bedrijf, gevolgd door serologisch onderzoek op *T. gondii* antilichamen bij 10 schapen (figuur 1).

Experimentele infectie 2 schapen (subdoel 2)

- Transport van twee *T. gondii* serologisch negatieve schapen naar 5.1 lid2h
- Oraal infecteren met *T. gondii* oöcysten
- Dagelijks temperaturen en beoordelen ademhalingsfrequentie gedurende de eerste twee weken.
- Wekelijks bloedafname voor bepaling antilichaamtiter tegen *T. gondii*.
- Tien weken na infectie: Transport van het dierverslijf naar de sectiezaal van 5.1 lid2h
- Anesthesie gevolgd door euthanasie van de schapen.
- Uitsnijden van hart, middenrif en spierdelen.

Experimentele infectie 3 schapen (subdoel 3 en 4)

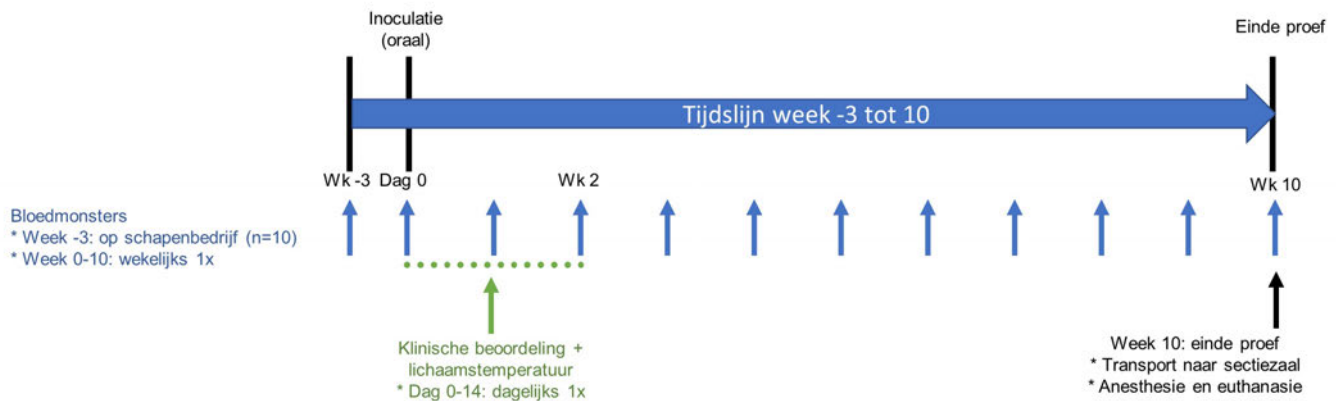
- Serologisch onderzoek resterende acht schapen
- Transport van drie serologisch negatieve schapen naar **5.1 lid2h**
- Oraal infecteren met T. gondii oöcysten
- Dagelijks temperaturen en beoordelen ademhalingsfrequentie gedurende de eerste twee weken. Er zijn nauwelijks klinische symptomen te verwachten na een infectie. En als het gebeurt, dan alleen tijdens de eerste twee weken na infectie.
- Wekelijks bloedafname voor bepaling antilichaamtiter tegen T. gondii. Voor de schapen die langer dan 10 weken worden aangehouden is er een bloedafname eens in de drie weken. Dit is ter controle van de antilichaam titers.
- Tien weken en 20 weken na infectie: Transport van het dierverslijf naar de sectiezaal van **5.1 lid2h**
- Anesthesie gevolgd door euthanasie van de schapen.
- Uitsnijden van hart, middenrif en spierdelen.

Primaire uitkomstparameters

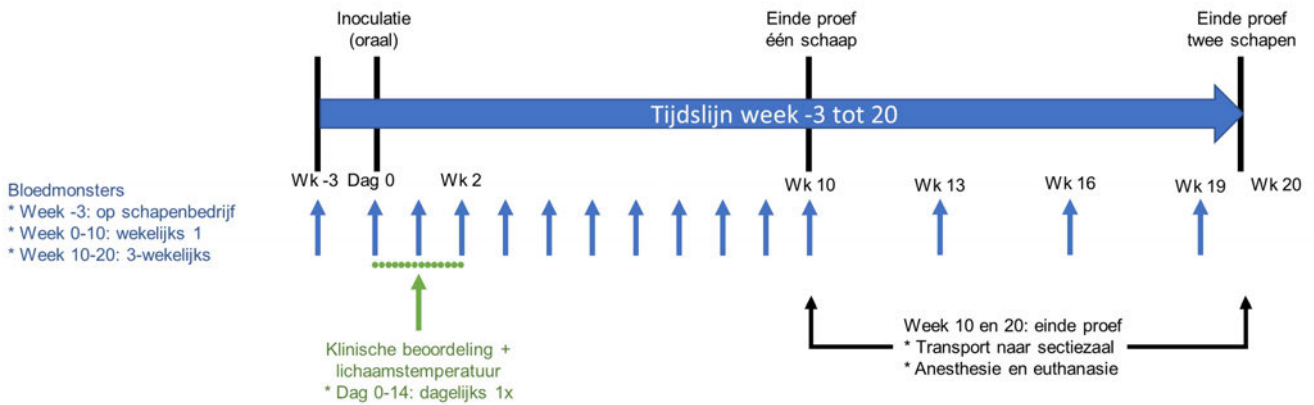
- Succesvolle selectie van een laag risico T. gondii schapenbedrijf en T. gondii serologisch negatieve schapen.
- Duidelijke immuunrespons na infectie meetbaar in besmette schapen.
- Succesvolle besmetting van schapen, zodat in hart, middenrif en spieren voldoende weefselcysten aanwezig zijn om op een valide manier de celkweek test uit te voeren.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Figuur 2: subdoel 2 – experimentele besmetting twee schapen



Figuur 3: subdoel 3 en 4 - experimentele besmetting drie schapen



Experimentele opzet

Kort overzicht van de handelingen aan de schapen (subdoel 2, figuur 2).

- maand -1: selectie T. gondii schapenbedrijf op basis van onderstaande criteria*. 5.1 lid2h betreft de schapen van vaste leverancier, dit schapenbedrijf zal ook nu benaderd worden.
- dag -21: bepaling T. gondii serologische status van het bedrijf. Daarvoor zullen 10 schapen geselecteerd worden en zal er bloed afgenomen worden van deze schapen via de vena jugularis, waarbij het schaap gefixeerd wordt en 5 ml bloed wordt afgenomen. □ 1 bloedafname – duur < 1 minuut.
- dag -7: selectie van twee schapen (van de 10 serologisch onderzochte) en transport van het schapenbedrijf naar de dierfaciliteiten van 5.1 lid2h. Het transport zal uitgevoerd worden met een vrachtauto, geschikt voor diertransport. □ Eenmalig transport – duur (maximaal 2 uur).
- dag 0: de twee schapen worden geïnfecteerd met 5×10^5 T. gondii oöcysten. De oöcysten zullen worden verkregen van een T. gondii onderzoeksgroep elders. De infectie met oöcysten zal middels orale toediening plaatsvinden. □ eenmalige orale toediening. Voor deze toediening worden de schapen kortdurend gefixeerd - duur < 1 minuut
- dag -7- week 10: ophokken van de schapen. Dit omdat kort na infectie er een darm passage kan plaatsvinden waardoor oöcysten in het milieu terecht kunnen komen. Verder ook om klinische monitoring en bloedafname gemakkelijker te maken.
- dag 0-14: dagelijks wordt de lichaamstemperatuur gemeten van de geïnfecteerde schapen en worden de schapen gemonitord op ademhalingsfrequentie. □ De schapen worden kortdurend gefixeerd om een rectale thermometer in te brengen die de lichaamstemperatuur meet. Observatie van het schaap vindt plaats op korte afstand – duur fixatie voor temperatuurmeting is enkele minuten.
- week 1-10: wekelijks bloedmonsters nemen tot het moment van euthanasie (week 10). □ bloedafname van deze schapen is via de vena jugularis, waarbij het schaap gefixeerd wordt en 5 ml bloed wordt afgenomen - duur < 1 minuut per afname - maximaal 10 bloedsamples per schaap.
- week 10: vervoer naar de sectiezaal van 5.1 lid2h voor euthanasie en sectie. □ Het vervoer is over een afstand van ± 10 km en zal uitgevoerd worden met een vrachtauto, geschikt voor diertransport. - duur transport < 30 minuten.
- week 10: Anesthesie gevolgd door euthanasie – de duur van het inleiden van de anesthesie is enkele seconden.

Kort overzicht van de handelingen aan de schapen (subdoel 3 en 4, figuur 3).

- dag -21: bevestiging van de (laag risico) T. gondii status van het bedrijf door bloedafname van

acht schapen voor bepaling T. gondii serologie. Dit betreft dezelfde schapen die in het kader van subdoel 2 al serologisch onderzocht waren op T. gondii.

- dag -7 selectie van drie schapen (van de acht serologisch onderzochte) en transport van het schapenbedrijf naar de dierfaciliteiten van 5.1 lid2h. Het transport zal uitgevoerd worden met een vrachtauto, geschikt voor diertransport. □ Eenmalig transport – duur (maximaal 2 uur).
- dag 0: de drie schapen worden geïnfecteerd zoals hierboven beschreven.
- dag -7 – week 20: ophokken van de schapen zoals hierboven omschreven voor dag -7 - week 10
- dag 0-14: zoals hierboven beschreven
- week 1-20: wekelijks bloedmonsters nemen van de drie schapen tot het moment van euthanasie voor het eerste schaap (van de drie en in week 10) en voor het tweede en derde schaap eens in de drie weken van week 10 tot week 20. □ bloedafname is via de vena jugularis, waarbij het schaap gefixeerd wordt en 5 ml bloed wordt afgenomen - duur < 1 minuut per afname - maximaal 10 bloedsamples voor het eerste schaap en maximaal 13 voor de overige twee schapen.
- week 10: vervoer naar de sectiezaal van 5.1 lid2h voor euthanasie en sectie. □ Het vervoer is over een afstand van ±10 km en zal uitgevoerd worden met een vrachtauto, geschikt voor diertransport. - duur transport < 30 minuten.
- week 10: Anesthesie gevolgd door euthanasie – de duur van het inleiden van de anesthesie is enkele seconden.

*Selectiecriteria voor het schapenbedrijf waar de schapen van betrokken worden:

Doel is om een schapenbedrijf te selecteren met een laag risico op T. gondii infecties. Criteria hiervoor zijn:

- Er komen geen abortussen voor als gevolg van een T. gondii infectie.
- Er wordt niet gevaccineerd tegen T. gondii. Gevaccineerde schapen hebben antilichamen tegen T. gondii en een experimentele infectie zal vanwege die reden niet aanslaan in deze schapen.
- Er zijn geen (jonge) katten op het schapenbedrijf.
- Serologisch onderzoek van 10 schapen (van de gewenste leeftijd) om te bevestigen dat het bedrijf een laag-risico T. gondii bedrijf is. Bloedafname zal plaatsvinden nog op het schapenbedrijf en wanneer deze schapen negatief testen is de kans dat T. gondii op het bedrijf voorkomt met een prevalentie van 26% of hoger kleiner dan 5% (<https://epitools.ausvet.com.au/herdsensfive>).
- Schapen zijn minimaal 10 weken oud. Op het tijdstip van euthanasie zijn ze 20 weken oud. Dan zijn ze groot genoeg om te zorgen voor voldoende vlees voor het beoogde onderzoek.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

Selectie schapen

- Twee schapen voor de experimenten voor subdoel 2 en vervolgens drie voor de subdoelen 3 en 4.

Benodigde aantal schapen voor het verkrijgen van voldoende T. gondii geïnfecteerd vlees

- Voor het uitvoeren van de procesmaatregelen zijn porties vlees nodig van 50 gram. Er zijn 16 verschillende procesmaatregelen gedefinieerd in overleg met de vleeswarenindustrie om die te testen (zie paragraaf 3.4.2 van het project proposal). Deze 16 procesmaatregelen (plus 8 controles) zullen twee keer uitgevoerd worden in subdoel 3. Totaal: 48 monsters a 50 gram = 2.4 kg vlees nodig. Weidelammeren van 20 weken oud wegen 31 - 33 kg. Ongeveer de helft hiervan is spierweefsel wat gebruikt kan worden voor de procesmaatregelen. Eén schaap is dus voldoende voor het uitvoeren van procesmaatregelen per subdoel.
- Vlees van geïnfecteerde schapen kan maximaal twee weken bij 4°C bewaard worden. Weefselcysten zijn levensvatbaar tijdens die periode. Dat betekent dat in die periode het vlees geschikt is voor onze analyses/ laboratoriumexperimenten. De laboratoriumexperimenten duren minimaal 6 weken voor ieder subdoel. Voor de uitvoering van de laboratoriumexperimenten voor een volgend subdoel is dus weer een 'nieuw' schaap nodig.

Aantal schapen benodigd voor subdoelstelling 2, 3 en 4

- In de literatuur (Dubey, 2009) wordt vermeld dat de kans erg groot is dat een infectie aanslaat maar dat er wel verschil is in weefsels die T. gondii positief worden. Om beter zicht te krijgen op verspreiding van T. gondii over de weefsels en over de hoogte van de T. gondii in de weefsels zullen experimenten met twee schapen worden uitgevoerd. Verder is het huisvesten van twee dieren in het kader van dierwelzijn beter dan het huisvesten van één solitair schaap.

- Nadat de experimenten op de eerste twee schapen gedaan zijn kunnen we vaststellen op basis van onze go-no go criteria of de aanpak voldoende geschikt is voor het beantwoorden van subdoelen 3 en 4.
- Voor subdoel 3 en 4 zullen drie schapen tegelijk worden geïnfecteerd. Voor de experimenten voor elk subdoel is één schaap nodig. Er zijn dus minimaal twee schapen nodig.
- De keuze om drie schapen te infecteren is omdat er altijd onvoorziene situaties kunnen optreden waardoor één van de schapen niet meer gebruikt kan worden. Bijvoorbeeld één van de dieren wordt ziek en moet voortijdig uit de proef gehaald worden. Of er ontstaat een onvoorziene situatie in het laboratorium waardoor herhaling van een experiment noodzakelijk is.
- Voor subdoel 3 zal één schaap worden gebruikt. Voor subdoel 4 blijven dan twee schapen over. Het huisvesten van twee dieren in het kader van dierwelzijn beter dan het huisvesten van één solitair schaap.

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	44 - Sheep	Afkomstig van reguliere leveranciers. 5.1 lid2h	>10 weken	10	Geen voorkeur. Afhankelijk van beschikbaarheid.	n.v.t.	Geen voorkeur. Afhankelijk van beschikbaarheid.

Provide justifications for these choices

Species

Schapen zullen experimenteel geïnfecteerd worden met T. gondii. In het project proposal in paragraaf 3.4.2 staat een verantwoording van de keuze hiervoor. Hieronder volgt een korte samenvatting.

- Schapen worden gemakkelijk geïnfecteerd met T. gondii en T. gondii is een belangrijk oorzaak van abortus bij schapen.
- Experimentele infecties van schapen gaan gepaard met weinig tot geen klinische symptomen.
- In het voorgaande project AVD5.1 lid2h is slachthuis materiaal (schapen harten) verkregen met als doel om T. gondii positieve harten te gebruiken in de experimenten. Helaas bleek tijdens de uitvoering van de experimenten dat de hoeveelheid geïnfecteerd vlees te laag was.
- De verwachting is dat geïnfecteerde schapen een meer betrouwbare bron van T. gondii positief vlees zijn dan harten van schapen uit het slachthuis, ook kan er gemikt worden op een hoge concentratie weefselcysten in het vlees van het schaap.
- Uit de literatuur blijkt dat ook varkens experimenteel geïnfecteerd kunnen worden om T. gondii positief vlees te verkrijgen. Net als schapen ontwikkelen varkens beperkte klinische symptomen en bij beide behoort een orale infectie met oöcysten tot de natuurlijke mogelijkheden voor een T. gondii infectie (Dubey, 2010). De voorkeur gaat echter uit naar schapen vanwege de opgedane ervaringen in het eerste project.
- Uit gegevens in de literatuur blijkt dat na infectie met T. gondii schapen 6 weken of langer (12 weken, 6 maanden) aangehouden voordat euthanasie plaatsvindt (Dubey et al., 2009; Esteban-Redondo 1999). Uit onderzoek van weefsels van de schapen op 6 weken of 6 maanden na infectie bleek geen verschil in de verspreiding van T. gondii (Esteban-Redondo et al., 1999).
- Uit de literatuur blijkt dat ook varkens experimenteel geïnfecteerd kunnen worden om T. gondii positief vlees te verkrijgen. Net als schapen ontwikkelen varkens beperkte klinische symptomen en bij beide behoort een orale infectie met oöcysten tot de natuurlijke mogelijkheden voor een T. gondii infectie (Dubey, 2010). De voorkeur gaat echter uit naar schapen vanwege de opgedane ervaringen in het eerste project.

Origin

Reguliere leveranciers van schapen aan 5.1 lid2h selectie op criteria benoemd onder Sectie A

Life stages

Ouder dan 10 weken.

Number

Zoals hierboven beschreven zal:

- serologisch onderzoek van 10 schapen (van de gewenste leeftijd) plaatsvinden om te bevestigen dat het bedrijf een laag-risico T. gondii bedrijf is.
- voor doel 2 twee schapen gebruikt worden en voor doel 3 en 4 drie schapen.

Gender

Er is geen voorkeur voor een geslacht. Het voornemen is om beide geslachten te gebruiken, afhankelijk van de beschikbaarheid bij de leverancier.

Genetic alterations

Geen

Strain

Geen voorkeur; afhankelijk van de beschikbaarheid bij de leveranciers

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Koorts: De normale lichaamstemperatuur van een schaap is tussen 38,5 en 40°C. In geval dat koorts ontstaat als gevolg van de infectie (mogelijk tijdens de eerste twee weken na infectie) die langer dan een dag aanhoudt (24 uur > 41°C) zal het schaap behandeld worden met een koortswerend middel. Hiervoor zal een niet-steroïdale anti-inflammatoire middel gebruikt worden (NSAID). Dit middel remt de ontstekingsreactie van het lichaam maar beïnvloedt de T. gondii parasiet niet.

Handelingen: Er zal mogelijk ongerief kunnen ontstaan door de orale toediening en bloedafnames, maar de verwachting is dat dit beperkt is. Vanwege dit beperkte en kortdurende ongerief is pijnverlichting onzes inziens niet opportuun omdat pijnverlichting ook pijn zal veroorzaken.

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

1. Subklinisch verloop na infectie: We verwachten nauwelijks tot geen klinische symptomen na een experimentele infectie van schapen met T. gondii. Dubey heeft in een review in 2009 een overzicht gemaakt van experimentele infecties in schapen die beschreven zijn in de literatuur. Uit dit review (van 16 studies) blijkt dat er niet tot amper klinische symptomen zijn na een T. gondii infectie. Schapen kunnen gedurende de eerste twee weken koorts krijgen en zo af en toe kan tijdens de koortsp periode benauwdheid optreden. Dit uit zich in een verhoogde ademhalingsfrequentie. Deze bevindingen worden bevestigd door collega Toxoplasma -onderzoeker Frank Katzer (Moredun, Schotland) met ervaring in experimentele infecties in schapen.

Andere ongeriefgevendende factoren kunnen zijn:

2. Transport: het eerste transport is van de leverancier naar de proefdierlocatie van **5.1 lid2h** en het tweede transport is van de proefdierlocatie van **5.1 lid2h** naar de sectiezaal van **5.1 lid2h**

3. Ophokken van de schapen bij 5.1 lid2h De schapen zijn bij de leverancier buiten, op de proefdierlocatie van 5.1 lid2h zullen ze binnen gehouden worden.

Explain why these effects may emerge.

1. Voor enkele dieren mogelijk kortdurende milde klinische verschijnselen (dit wordt niet verwacht) als gevolg van de blootstelling aan T. gondii oöcysten.
2. Transport naar de sectiezaal van 5.1 lid2h omdat daar onder de juiste condities de anesthesie, euthanasie en sectie uitgevoerd kunnen worden. De sectiezaal is hiervoor ingericht en de medewerkers die er werken zijn er voor opgeleid.
3. Verandering van huisvesting ontstaat doordat de dieren bij de leverancier buiten werden gehouden en bij 5.1 lid2h binnen.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

1. Handelingen aan de schapen worden uitgevoerd door bekwame biotechnici die in dagelijks contact zijn met de schapen zodat de dieren reeds gewend zijn aan contact met hen.
2. Een enkel schaap kan lichte klinische verschijnselen vertonen als gevolg van de T. gondii infectie. Dit is alleen voorzien tijdens de eerste twee weken na infectie. Door in die weken dagelijks de lichte temperatuur te meten en dagelijks het gedrag te observeren wordt dit gemonitord. Als één van de parameters een humaan eindpunt impliceert dan wordt het schaap vroegtijdig gedood en het benodigde weefsel van het schaap verzameld. De klinische beoordeling wordt uitgevoerd door biotechnici die ook de verzorging en handelingen aan de dieren doen. Doordat de biotechnici intensief interactie hebben met de schapen zullen ze afwijkend gedrag eerder waarnemen.
3. Het transport van de leverancier naar 5.1 lid2h duurt maximaal 2 uur. Transport van het diervverblijf naar de sectiezaal duurt maximaal 30 minuten. De schapen zullen in vrachtauto vervoerd worden die geschikt is voor diertransport.
4. Verandering van huisvesting (buiten naar binnen) geeft stress, maar een acclimatisatieperiode (van één week) helpt de schapen om te dealen met die stress.

E. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question F.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

HEPs

- Twee dagen 41°C en reageert niet op een koortsremmend middel.
- Eet en drinkt niet en is sloom. Is, ondanks eventuele toediening van medicatie, gedurende 24 uur niet in staat om zelfstandig naar de eet- of drinkbak te gaan.
- Normale ademhalingsfrequentie voor schapen is 20 à 30 per minuut. Het HEP wordt bereikt als de ademhalingsfrequentie is drie keer zo hoog (80 à 90 per minuut) gedurende 24 uur.

Als het schaap aan één van deze drie HEPs voldoet, dan zal het schaap geëuthanaseerd worden om verder lijden van het schaap te voorkomen.

Indicate the likely incidence.

Het wordt niet verwacht dat schapen het humane eindpunt zullen bereiken, dus dit zal een uitzonderlijke situatie betreffen. De kans wordt ingeschat op < 1 %.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

No.	Procedure	Mate van ongerief	Duur van ongerief/max frequentie	Hoeveel schapen
1	Bloedafnames op schapenbedrijf voor selectie 2 schapen	Licht	1 minuut / éénmalig	10
2	Bloedafnames op schapenbedrijf voor selectie 3 schapen	Licht	1 minuut / éénmalig	8
3	Bloedafnames	Licht	1 minuut / 10 keer	1
4	Bloedafnames	Licht	1 minuut / 13 keer	2
5	Orale toediening van oöcysten	Licht	1 minuut / éénmalig	5
6	Lichaamstemperatuur metingen	Licht	1 minuut / 7 keer	5
7	Transport naar dierfaciliteit 5.1 lid2h sectiezaal	Licht	2 uur / éénmalig	5
8	Transport naar sectiezaal 5.1 lid2h	Licht	30 minuten / éénmalig	5
9	Anesthesie	Licht	1 minuut / éénmalig	5

Voor de negen procedures samen is de cumulatieve mate van het ongerief voor de schapen: orale toediening, frequente bloedafname gedurende lange tijd 100% matig.

G. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement

Zonder infectie van deze schapen kan het doel van het onderzoek (beheersen T. gondii voedselveiligheidsrisico's) niet bereikt worden.

1. Er is T. gondii besmet vlees nodig voor het uittesten van de verschillende procesmaatregelen en valideren van de celkweek als alternatief voor de muisbioassay. In het eerste project is geprobeerd om de procesmaatregelen uit te voeren met harten van schapen, verkregen in het slachthuis. Dit bleek echter een niet begaanbare weg omdat er onvoldoende positief materiaal werd verkregen (zie paragraaf 3.1 van het project proposal). De verwachting is dat door een experimentele infectie wel voldoende positief materiaal verkregen wordt. In een experimentele studie is de infectiegraad beter te sturen en dat maakt de kans op succes groter.
2. Een mogelijkheid om T. gondii positief vlees te verkrijgen is door het toevoegen van weefselcysten aan gemalen vlees. Echter, dit is een artificiële situatie en om de effectiviteit van de procesmaatregelen te kunnen testen is het gewenst om uit te gaan van vlees van een dier dat met T. gondii geïnfecteerd is omdat dit de werkelijkheid het beste benadert. Verder kunnen weefselcysten die in vlees aanwezig zijn mogelijk anders op de additieven reageren dan vrije weefselcysten die aan gemalen vlees worden toegevoegd. Voor het verkrijgen van weefselcysten is bovendien een dierproef nodig omdat weefselcysten alleen uit levende dieren verkregen kunnen worden.
3. Preventie van T. gondii infecties in dieren door een andere manier van dierhouderij met meer buitenloop van dieren is geen optie, buitenloop heeft eerder een averechts effect op T. gondii infecties in dieren. Vanwege de verspreiding van T. gondii in het milieu is het bijkans onmogelijk dat dieren (waaronder vooral runderen en schapen) die buiten lopen geen infectie met T. gondii oplopen. Preventie van T. gondii infecties in dieren door een strikt hygiëne regime waarbij de dieren niet meer buiten kunnen komen zou de T. gondii risico's verminderen. In de varkenshouderij in Nederland worden de meeste varkens gehouden onder gecontroleerde huisvestingscondities zonder buitenloop. Daardoor zijn de T. gondii risico's op deze bedrijven gemakkelijker te beheersen dan op schapen- en runderbedrijven waar dieren veel buiten zijn en dus geïnfecteerd kunnen raken met T. gondii. Een striktere hygiëne betekent ook dat welzijn van dieren daardoor in gedrang komt.

Reduction

1. Het geïnfecteerde schapenvlees wordt gebruikt voor twee doelstellingen: 1) vervangen van de muisbioassay door een in vitro alternatief en 2) om de huidige procesmaatregelen voor de bereiding van rauwe vleeswaren te evalueren en indien nodig aan te passen. Op zich zouden beide doelstellingen in twee aparte projecten en los van elkaar uitgevoerd kunnen worden. In dit project opzet worden ze gecombineerd waardoor minder dieren nodig zijn.
2. De eerste vraag die beantwoord zal worden in dit project is of er met een experimentele infectie van schapen voldoende T. gondii positief vlees verkregen kan worden om de procesmaatregelen te testen. Bij het eerste project werden harten van schapen uit het slachthuis gebruikt. Het bleek dat de concentratie van T. gondii parasieten in deze harten te laag was om de procesmaatregelen te testen. Dit is dus een kritisch onderdeel van het project en daarom is als subdoel 2 opgenomen of er voldoende T. gondii parasieten in het vlees aanwezig zijn en of het challenge model leidt tot het verkrijgen van voldoende T. gondii geïnfecteerd vlees. Wanneer het antwoord op deze vragen 'ja' is dan worden pas de volgende schapen geïnfecteerd met T. gondii.

Refinement

1. Bij de keuze van het aantal schapen is er op gelet om te voorkomen dat de schapen solitair worden gehuisvest. Dus dat er minimaal twee dieren bij elkaar lopen.
2. Er zijn weinig klinische symptomen te verwachten en bij koorts worden NSAIDs gebruikt.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

I. Repetition Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

n.v.t.

J. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

Op een regulier commercieel schapenbedrijf wordt bloed van schapen afgenomen voor screening.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Alleen de eerste bloedafname wordt gedaan bij de leverancier van de schapen. Dat is geen geregisteerde proefdier faciliteit. De vergunninghouder stelt de NVWA hiervan op de hoogte.

Het overige deel wordt uitgevoerd bij **5.1 lid2h** een geregistreerde proefdierfaciliteit.

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Het besmette weefsel is nodig om de proef te vervolgen. Dit weefsel wordt na het doden verkregen uit het dier en het betreft het hart, middenrif en spierweefsel.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

n.v.t.



Centrale Commissie Dierproeven

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028)

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	5.1 lid2h	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	5.1 lid2h	
1.3	List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number 2	Type of animal procedure Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Doel en algemene opzet van deze dierproef

De muisbioassay zal uitgevoerd worden om de resultaten verkregen met de celkweek te confirmeren en op die manier de celkweek te valideren (zie project proposal subdoel 4). De muisbioassay is de 'gouden standaard' en de enigste beschikbare methode om levende *T. gondii* parasieten aan te tonen in rauwe vleeswaren. De muisbioassay is een dierproef, het is de bedoeling dat de celkweek de muisbioassay gaat vervangen. In subdoel 2 (zie project proposal) is al nagegaan met de celkweek welke concentraties van zout en andere additieven *T. gondii* in *T. gondii*-positief schapenvlees inactiveren en daarmee de vleeswaren veiliger maken. Nu worden de testen in de celkweek herhaald en vergeleken met de resultaten van de muisbioassay.

De opzet van de muisbioassay zoals in deze bijlage beschreven is hetzelfde als de opzet van de voorgaande vergunning waarbij deze assay ook gebruikt is, namelijk AVD5.1 lid2h (Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende *Toxoplasma* parasieten in vlees met de muis bioassay).

De algemene opzet van deze dierproef wordt weergegeven in figuur 1:

Muisbioassay

Dag 0: Nemen van bloedmonsters en intraperitoneale inoculatie

Klinische beoordeling
* Dag -7 - 0: 1 x per dag

Klinische beoordeling
* Dag 0 - 14: 3 x per dag
* Dag 15 - 42: 1 x per dag



Subdoel 4

- Transport naar proefdierfaciliteit van [5.1 lid2h](#)
- Baseline bloedafname
- Inoculatie van 1 ml weefseldigest
- Dagelijkse klinische beoordeling van de muizen
- Onder anesthesie wordt bloed en weefsel afgenomen en daarna vindt de euthanasie plaats.

Primaire uitkomstparameters

- Bloedmonsters worden genomen aan het begin (gecombineerd met inoculatie) en eind (tijdens de euthanasie) van de proef. Beide bloedmonsters worden gebruikt om te onderzoeken op T. gondii antilichamen. Het eerste bloedmonster is een nulbloedmonster ter controle op afwezigheid van T. gondii antilichamen, het bloedmonster tijdens de euthanasie is om een eventuele antilichaamrespons te meten. Het meten van T. gondii antilichamen is indicatief voor een T. gondii infectie. Meestal ontwikkelt een muis klinische symptomen als gevolg van de T. gondii infectie en wordt de muis geëuthanaseerd voordat de antilichaamrespons detecteerbaar is. Soms verloopt de infectie subklinisch en ontwikkelt de muis een antilichaamrespons. Dit duidt op een T. gondii infectie.
- Hersenen worden verzameld om te onderzoeken met de PCR op T. gondii. Ongeveer twee weken na infectie migreren de tachyzoieten uit de buikholte naar het weefsel en ook naar de hersenen. Het aantonen van T. gondii in de hersenen duidt op de aanwezigheid van levende en daarom infectieuze T. gondii.
- Buikvocht wordt bij muizen die in de periode 4 -14 dagen na infectie geëuthanaseerd ook nog verzameld. Twee weken is te kort om weefselcysten te vormen in de hersenen, in die periode worden er alleen nog tachyzoieten in de buikholte gevormd en daarom wordt er ook buikvocht verzameld.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Experimentele opzet

Kort overzicht van de handelingen aan de muizen

1. dag -7: transport van 5.1 lid2h naar de proefdierfaciliteiten van 5.1 lid2h De benodigde tijd hiervoor zal ongeveer 12 uur zijn. De muizen worden bij 5.1 lid2h gehouden onder hBSL-2 condities (humaan biosafety level 2). Het gaat om Gamma-interferon-knockout muizen (GKO muizen) (zie voor details onderdeel B). Deze muizen zijn beschikbaar bij het FLI en worden als een onderdeel van de bijdrage aan het project door het 5.1 lid2h (5.1 lid2e) ter beschikking gesteld.
2. dag -7-0: dagelijks één keer klinische beoordeling. Dit is een onderdeel van de dagelijkse verzorging van de muizen.
3. dag -1-14: continue toediening van buprenorphine hydrochloride door drinkwater. Dit wordt gedaan om pijn en ongerief te bestrijden. Er wordt gestart op dag -1, dit is om een spiegel op te bouwen. Toediening is tot dag 14, dit is gedurende de periode dat de muizen het meeste ongerief hebben.
4. dag 0: bloedafname van de muizen. Voor deze handeling worden de muizen gefixeerd. Bloed wordt verkregen via een wangprik (submandibulaire punctie). □ 1 bloedafname – duur < 1 minuut
5. dag 0: intraperitoneale inoculatie van 1 ml weefseldigest (verteerd weefsel afkomstig van vlees van de procesbehandeling). Voor deze toediening worden de muizen gefixeerd. □ 1 toediening – duur < 1 minuut. Bloedafname en inoculatie worden achter elkaar uitgevoerd zodat het dier slechts eenmaal gefixeerd hoeft te worden.
6. dag 1-3: dagelijks drie keer klinische beoordeling omdat enkele dieren snel klinische verschijnselen ontwikkelen. Wanneer zieke muizen voldoen aan de HEPs worden de muizen geëuthanaseerd. Voor euthanasie wordt de muis gefixeerd. De muis worden onder anesthesie gebracht en volgens wordt het dier gedood door nekstrekking. - □ duur < 1 minuut.
Ter vervanging van de muis die geëuthanaseerd is wordt één van de reservemuizen intra peritoneaal geïnoculeerd met 1 ml van het weefseldigest zoals hierboven omschreven. Het betreft dan hetzelfde weefseldigest waar de gedode muis mee geïnoculeerd was. Deze periode is tekort voor het zich manifesteren van een T. gondii infectie, meestal is er in dit geval sprake van een bacteriologische infectie van de muis als gevolg van het toedienen van het weefseldigest.
7. dag 4-14: dagelijks drie keer klinische beoordeling. Wanneer zieke muizen voldoen aan de HEPs wordt een bloedmonster genomen van de muis en wordt de muis geëuthanaseerd. Voor euthanasie wordt de muis gefixeerd, onder anesthesie gebracht, een bloedmonster (oogextractie) genomen en daarna gedood - □ duur enkele minuten. Ook wordt buikvocht wordt verzameld om getest te worden met de PCR op T. gondii.
8. dag 15-42: dagelijks één keer klinische beoordeling. De ervaring van het vorige experiment is dat in deze fase de muizen niet meer klinisch ziek worden, om die reden wordt de frequentie verminderd dan drie naar één keer per dag. Wanneer zieke muizen voldoen aan de HEPs wordt een bloedmonster genomen zoals hierboven beschreven onder punt 7. De hersenen van de muizen worden verzameld om getest te worden met de PCR op T. gondii.
9. dag 42: einde proef. Van de resterende muizen worden bloedmonsters genomen en de hersenen verzameld zoals beschreven onder punt 7 en 8.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

Er worden twee muizen gebruikt per monster. Het inoculum wordt verdeeld over beide muizen. Op basis van de voorafgaande studies is vastgesteld dat de bepalingen in duplo uitgevoerd dienen te worden om een goede betrouwbaarheid te verkrijgen. Om deze reden worden met één monster twee muizen geïnoculeerd.

Muisbioassay (eerste deel): dosis response bradyzoieten (tabel 1)

Om de detectielimiet te bepalen wordt een dosis response studie uitgevoerd. Daarvoor wordt een reeks bradyzoeten bereid van laag tot hoog. Er is gekozen voor een reeks van 10 tot 10.000 bradyzoeten. Uit literatuur blijkt dat de detectielimiet (voor stam ME-49) in Swiss Webster muizen ongeveer 400 bradyzoeten is (Guo et al. 2016). De detectielimiet wordt bepaald in kweekmedium. Ook wordt nagegaan wat het effect is van de matrix op de detectielimiet. Daarvoor worden bradyzoeten toegevoegd aan digest van T. gondii negatief schapenvlees. De detectielimiet zal bepaald worden in celkweek en in de muisbioassay (zie tabel1).

Tabel 1: Sensitiviteit en invloed matrix

Dosis / matrix	Aantal proefgroepen	Aantal muizen
Kweekmedium (in duplo) als negatieve controle	2	4
10, 100, 1000, 10.000 levende bradyzoiten in kweekmedium (in duplo)	8	16
Vleesdigest schaap zonder spike (in duplo) als negatieve controle	2	4
10, 100, 1000, 10.000 levende bradyzoiten in vleesdigest schaap (in duplo)	8	16
Totaal	20	40

Muisbioassay (tweede deel): bevestiging van effectiviteit procesmaatregelen

In overleg met de producenten van vleeswaren zijn 16 procesmaatregelen opgesteld (met de daarbij behorende controles) die getest zullen worden op afdoding van T. gondii in de celkweek. Deze bevatten een reeks aan NaCl concentraties, en toevoeging van natriumlactaat en natriumacetaat bij een vaste concentratie NaCl. De concentraties zijn zodanig gekozen dat ze alle recepturen van de vier bij dit project betrokken producenten van vleeswaren omvatten (zie voor details project proposal 3.4.2.)

Tabel 2: Procesmaatregelen

Groepen / matrix	Aantal proefgroepen	Aantal muizen
<u>Week 1</u>		
• Testdag 1: Serie 1 t/m 12		
o Geïnfecteerd vlees verdelen in 50g porties.		
o Acht procesmaatregelen.	8	16
o Vier controles: 1 x vlees negatief onbehandeld, 1x vlees met weefselcysten, 2 x positief vlees onbehandeld	4	8
• Testdag 2: serie 13 t/m 24		
o Geïnfecteerd vlees verdelen in 50g porties.		
o Acht procesmaatregelen.	8	16
o Vier controles: 1 x vlees negatief onbehandeld, 1x vlees met weefselcysten, 2 x positief vlees onbehandeld	4	8
<u>Week 2</u>		
• Herhaling testdag 1 en 2	24	48
Totaal muizen	48	96

Reservemuizen

- Uit de resultaten van het voorgaande project AVD **5.1 lid2h** (Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassay) bleek dat in de eerste drie dagen na infectie er 5 muizen van de 102 (5%) doodgingen. Hierboven (onder experimentele opzet) staat beschreven dat ziekte en sterfte binnen de eerste drie dagen na inoculatie een te korte periode is voor een T. gondii infectie om zich te manifesteren en dat om die reden deze muizen worden vervangen door andere muizen.
- Op basis van de ervaringen in het voorgaande project verwachten we dus dat we 5% van de muizen moeten vervangen.
- In dit project zijn 40 (Tabel 1) en 96 (Tabel 2) muizen nodig. Totaal 136. Het aantal reservemuizen is 5% van 136 is 7 muizen.

Totaal aantal muizen wordt $40+96+7= 143$

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	01 - Mice	Afkomstig van 5.1 lid2h	Minimaal 6 weken	143	Beide geslachten	gamma-interferon-knockout mice	IFN gamma -/- (C.129S7(B6)-Ifngtm1Ts/J)

Provide justifications for these choices

Species

Voor de bioassay worden muizen gebruikt. Voor details zie project proposal paragraaf 3.1.

Dit is een internationaal aanvaarde gouden standaard voor het bepalen van de aanwezigheid van levend T. gondii. Op dit moment is de muisbioassay de enige methode waarmee onderzocht kan worden of vlees(producten) levende T. gondii bevatten of niet.

Origin

Muizen worden verkregen van de proefdierfaciliteit van het 5.1 lid2h (5.1 lid2e). Het 5.1 lid2h heeft een eigen muizenfokkerij voor muizen die gebruikt worden voor het T. gondii onderzoek bij het 5.1 lid2h. De muizen worden gehouden "under disease controlled conditions" in een gebouw apart van de onderzoeksfaciliteiten.

Life stages

Minimaal 6 weken oud

Number

143. Zie voor berekening van het aantal de tekst hierboven.

Gender

Beide geslachten zijn geschikt voor deze experimenten

Genetic alterations

Gamma-interferon-knockout muizen (GKO muizen) worden gebruikt in dit project. GKO muizen zijn succesvol gebruikt in eerdere studies waar de muisbioassay werd toegepast. Deze muizen zijn gevoeliger voor een T. gondii infecties dan bijv. Swiss Webster muizen die ook wel gebruikt worden voor de T. gondii muisbioassay.

Strain

IFN gamma -/- (C.129S7(B6)-Ifngtm1Ts/J)

<https://www.jax.org/strain/002286>

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

D. Pain and compromised animal welfare

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

1. Om pijn en ongerief te bestrijden zal buprenorphine (0.05 mg/kg muis) op dag -1 tot en met dag 14 worden toegediend aan de muizen via het drinkwater. Het doel van deze toediening is om het ongerief van de eerste infectieresponse te verminderen. Toediening hiervan vermindert het ongerief en pijn maar niet de uitkomst van een acute *T. gondii* infectie (Lindsay et al., 2005, The Journal of parasitology 91, 1488-1490).
2. Voorafgaand aan euthanasie met bloedafname worden de muizen onder anesthesie gebracht.

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

1. Experimentele handelingen: bloedafname, intra peritoneale injectie met weefsel digest, intra peritoneale injectie voor anesthesie.
2. Muizen kunnen in de eerste drie dagen na de intra peritoneale toediening van weefseldigest een peritonitis ontwikkelen als gevolg van een bacteriële infectie.
3. Muizen kunnen tot \pm 2 weken na de intra peritoneale injectie met weefseldigest ziek worden als gevolg van een *T. gondii* infectie met als belangrijkste verschijnselen koorts, algehele malaise en vorming van buikvocht (door een combinatie van leverschade en peritonitis).

Explain why these effects may emerge.

1. Kortdurende handelingen als gevolg van de gekozen experimentele opzet.
2. Bij een peritonitis binnen 3 dagen na toediening van het weefseldigest kan er sprake zijn van een bacteriële infectie. Oorzaak hiervan is dat organen en weefsels van de gebruikte schapen bacteriologisch verontreinigd kunnen zijn. Als gevolg daarvan kunnen er ook bacteriën in het weefseldigest aanwezig zijn en ziekte veroorzaken bij de muizen.
3. Muizen kunnen na een intra peritoneale injectie met weefseldigest ziek worden als gevolg van groei van *T. gondii* tachyzoieten en bijbehorende ontstekingsreacties. Mogelijk worden HEP's bereikt. Zo niet, dan eindigt de acute fase van de infectie na ongeveer twee weken wanneer de tachyzoieten zich naar alle weefsels inclusief de hersenen verspreiden en weefselcysten vormen (Dubey 2009). De weefselcysten blijven latent aanwezig, maar veroorzaken geen ziekteverschijnselen.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

1. Alle handelingen worden uitgevoerd door getrainde biotechnici zodat de handeling op een correcte en snelle manier uitgevoerd wordt.
2. Vaste biotechnici scoren dagelijks de muizen op mogelijke ziekteverschijnselen en ervoor zorgen dat tijdig wordt onderkent wanneer een muis een HEP bereikt. De meeste van deze medewerkers zijn eerder ook al betrokken geweest bij uitvoering van de muisbioassay voor *T. gondii* tijdens de uitvoering van de voorgaande vergunning. Samen met deze medewerkers is de klinische scoringsmethode ervaring opgedaan.
3. Om te voorkomen dat een muis een bacteriële infectie krijgt als gevolg van toediening van weefseldigest wordt er een antibioticum-cocktail toegevoegd aan het weefseldigest. Deze antibiotica (penicillinstreptomycine, amoxicilline) hebben geen effect op *T. gondii*.

E. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question F.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

- HEPs worden toegepast als het ongerief van een individuele muis de in dit project beschreven bovengrens overschrijdt.
- De muizen worden geëuthanaseerd ter voorkoming van uitzichtloos of ernstig lijden. Een coderingslijst voor HEPs wordt gebruikt zoals gebruikt in het vorige project (AV5.1 lid2h) en voor het Toxoplasma EFSA project in 2015 en beschreven in het EFSA rapport van Opsteegh et al., 2016 (www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/995e).

Categorie	Omschrijving	Score
A: Conditie vacht <i>selecteer optie die het meest van toepassing is (max score 2)</i>	Gladde (aansluitende) glimmende vacht	0
	Ruwe (opgezet) vacht	1
	Stijve vacht, blijft opgezet	2
B: Houding/ gedrag <i>meerdere opties tegelijk mogelijk (cumulatieve score, max score 3)</i>	Alert en actief	0
	Ineengedoken en bolle rug tijdens het lopen	1
	Passief tijdens handelingen	1
	Wankelende gang (incoördinatie)	1
Muizen worden geëuthanaseerd als een muis een maximum score heeft bereikt in categorie A (score 2) of B (cumulatieve score 3) of als een muis een totale score van 3 heeft (A+B).		

Alle muizen worden één tot drie keer per dag klinisch beoordeeld afhankelijk van de fase van het experiment.

Indicate the likely incidence.

- In 2017 werd de muisbioassay ook uitgevoerd bij 5.1 lid2h in een (vergelijkbaar) eerder project. (AV5.1 lid2h).
- Van de 102 muizen werden 5 muizen werden dood aangetroffen in de eerste drie dagen na inoculatie, 4 muizen werden dood aangetroffen in de periode van dag 4 - dag 14. Totaal 9 muizen van de 102 (9%).
- Daarnaast voldeden tijdens de proef 60 muizen aan de HEPs en deze muizen werden geëuthanaseerd.
- Op basis van deze getallen verwachten we dat de incidentie 69 (60+5+4) van de 102 (68%) is.
- Als het HEP bereikt wordt voor muizen vanaf dag 4, is het doel van de proef voor de betreffende muis bereikt. De muizen zijn dan voldoende ziek om de uitkomst parameters van een T. gondii infectie te verzamelen. Toepassing van de HEPs gaat niet ten koste van de resultaten uit de proef.
- Als het HEP bereikt wordt voor muizen in de eerste drie dagen na inoculatie dan is het doel van de proef niet bereikt voor die muizen. Om die reden worden deze muizen vervangen door reservemuizen (zie ook hierboven het onderdeel over reservemuizen).

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Fasen in infectie van muizen met T. gondii. De frequentie van de klinische beoordeling is hierop afgestemd.

- Dag 1-3: als muizen in deze periode ziek worden en doodgaan is dat niet als gevolg van een T. gondii infectie. Meest waarschijnlijk is dat dit gebeurt vanwege een bacteriële infectie (vanwege bacteriën in weefseldigest). Om dit zoveel mogelijk te voorkomen wordt een antibioticumcocktail toegevoegd aan het weefseldigest. Desondanks kunnen er muizen ziek worden en doodgaan. Dagelijks worden de muizen in deze periode drie keer klinisch gescoord.
- Dag 4-14: dit is het tachyzoieten stadium van T. gondii. In deze periode kunnen muizen ziek worden de meeste klinische verschijnselen waargenomen. Dagelijks worden de muizen in deze periode drie keer klinisch gescoord.
- Dag 15-42: dit is het weefselcyste stadium van T. gondii, er worden amper nog klinische symptomen waargenomen. Dagelijks worden de muizen in deze periode één keer klinisch gescoord.

No.	Procedure	Mate van ongerief	Duur van ongerief/max frequentie	Hoeveel muizen
1	Bloedafname	Licht	1 minuut / 1 keer	143
2	Intraperitoneale infectie met weefseldigest	Licht	1 minuut / éénmalig	143
3	Anesthesie	Licht	1 minuut / éénmalig	143

Ondanks toepassen van de HEPs is in het vorige project gebleken dat er 9% (9 van de 102) muizen stierven omdat ze tussen twee observatiemomenten doodgingen en het humane eindpunt niet op tijd kon worden toegepast. Op basis hiervan wordt dus voor 13 (9%) van de muizen ernstig ongerief verwacht en voor 130 (91%) muizen matig (handelingen die licht ongerief geven i.c.m. met milde klinische verschijnselen) ongerief.

Om ernstig ongerief te voorkomen is het observatieprotocol aangepast van twee keer naar drie keer per dag. Dit is om de muizen intensiever klinisch te beoordelen tijdens de kritische periode (dag 0-14). Door intensivering van toepassing van de HEPs is het de verwachting dat het aantal muizen met ernstig ongerief lager zal zijn dan in het voorgaande project.

G. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement

Zonder de muisbioassay kan op dit moment het doel van het onderzoek (beheersen T. gondii voedselveiligheidsrisico's van rauwe vleeswaren) niet bereikt worden:

1. De muisbioassay is de enige test waarmee levende T. gondii parasieten kunnen worden aangetoond in vlees. In dit project wordt de celkweek als alternatief voor de muisbioassay ontwikkeld en gevalideerd. Dit betekent dat de celkweek en de muisbioassay met elkaar worden vergeleken.
2. Om de muisbioassay te kunnen vervangen wordt in dit project de celkweek ontwikkeld en gevalideerd. De resultaten van de celkweek worden ook al binnen dit project gebruikt en daarmee draagt de celkweek al bij aan het verkrijgen van resultaten.

Reduction

1. In dit project wordt de celkweek ontwikkeld om de voedselveiligheid van rauwe vleeswaren te onderzoeken. Via wetenschappelijke publicaties, lezingen en workshops zullen de resultaten breder onder de aandacht gebracht worden zodat de muisbioassay niet onnodig gebruikt wordt. Dit zal bijdragen aan de reductie van muizen voor deze toepassing. Er zouden mogelijk andere alternatieven kunnen ontstaan op basis van de verkregen resultaten bijv celkweek voor andere detecties binnen het T. gondii onderzoek en die nog met gebeuren.
2. De resultaten van de celkweek worden ook al binnen het project gebruikt waardoor minder herhalingen in de muisbioassay nodig zijn.
3. In dit project worden IFNg knockout muizen gebruikt. Deze dieren raken makkelijker geïnfecteerd, waardoor de test gevoeliger is. Met Swiss Webster zouden mogelijk meer muizen per digest nodig zijn om er zeker te zijn dat er geen levende T. gondii aanwezig is.

Refinement

1. Muizen zijn een goede diersoort gebleken voor een T. gondii infectie. Muizen zijn gevoelig voor T. gondii infecties. In de natuur worden ze ook gemakkelijk geïnfecteerd met T. gondii en als prooi voor de katten is de parasitaire cirkel rond.
2. Vanuit literatuur is bekend dat buprenorphine hydrochloride gemengd met het drinkwater de pijn en ongerief van een T. gondii infectie verminderen. Om die reden wordt buprenorphine hydrochloride via het drinkwater aangeboden.
3. Humane eindpunten zijn gedefinieerd om het ongerief zoveel mogelijk te beperken. Ervaring met het uitvoeren van de muisbioassay leert dat voor 9% van de muizen het ongerief ernstig was (muizen dood gevonden). Door intensivering van de klinische monitoring (van twee naar drie keer per dag) op de HEPs is het de verwachting dat dit aantal sterk gereduceerd wordt.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

I. Repetition Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to

ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

n.v.t.

J. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Bloed en peritoneaal vocht of hersenen zullen verzameld worden om serologisch of met de PCR onderzocht te worden om vast te stellen of de muis een T. gondii infectie heeft doorgemaakt.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

n.v.t.

Naam van het project	Bepalen van het effect van zout en andere toevoegingen in rauwe vleeswaren op Toxoplasma gondii met een nieuwe proefdiervrije methode.
NTS-identificatiecode	NTS-NL-425531 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Voedselveiligheid Toxoplasma gondii Celkweek Vleeswaren
Doel(en) van het project	Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Besmettelijke ziekten van de mens

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

<p>Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).</p>	<p>Toxoplasma gondii is een parasiet en deze ziekteverwekker kan voorkomen in rauw gegeten vleeswaren zoals filet americain, ossenworst en rauwe ham. In Nederland staat T. gondii op de tweede plaats na Campylobacter op de ranglijst van 14 door voedsel overgedragen ziekteverwekkers. T. gondii is de veroorzaker van toxoplasmose en vrijwel alle warmbloedige dieren, inclusief mensen kunnen besmet worden. Ongeveer een derde van de wereldbevolking is geïnfecteerd met deze parasiet. Zwangere vrouwen en mensen die door andere ziektes een sterk verminderde afweer hebben vormen de belangrijkste risicogroepen.</p> <p>Ondanks waarschuwingen vanuit de overheid (Voedingscentrum en RIVM) voor de risico's op een T. gondii infectie worden binnen Nederland maar ook wereldwijd veel rauwe vleeswaren gegeten.</p> <p>Het RIVM onderzoekt elk jaar hoeveel mensen ziek worden of sterven aan ziekteverwekkers die via voedsel worden overgedragen. Zij stellen vast dat de ziektelast van T. gondii door het eten van rauwe vleeswaren nog steeds te hoog is. Kennisinstellingen en de vleeswarenindustrie hebben daarom een samenwerkingsverband gevormd om de voedselveiligheid, dus het doden van T. gondii in rauwe vleeswaren, te verbeteren.</p> <p>In dit onderzoek wordt gezocht naar een manier om T. gondii te doden in rauwe vleeswaren. Daarvoor wordt het effect van zout en andere toevoegingen tijdens de bereiding van rauwe vleeswaren bepaald op de afdoding van T. gondii. In een eerdere studie is al gebleken dat het effect van zout groot is op afdoding van T. gondii. Dit onderzoek zullen we vervolgen en nagaan welke minimale concentraties zout en andere toevoegingen voldoende afdoding van T. gondii in vlees opleveren.</p> <p>Om de besmettelijkheid van T. gondii aan te tonen wordt er tot op heden gebruik gemaakt van een dierproef met muizen. In dit project wordt onderzocht of deze dierproef kan worden vervangen door een proefdiervrij alternatief, namelijk een celkweek. In ons onderzoek zal dit alternatief worden getest om te bewijzen dat deze inderdaad een geschikte vervanging is.</p> <p>De doelstellingen van dit project zijn:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Een diermodel met schapen opzetten om voldoende T. gondii besmet vlees te verkrijgen. Op deze
---	--

wijze wordt de werkelijke situatie van T. gondii besmet vlees het beste benaderd.
-Met het verkregen T. gondii positief vlees nagaan welke concentraties van zout en andere toevoegingen T. gondii inactiveren.
-Vergelijken van de T. gondii inactivatie met de testmethode in muizen en met de celkweekmethode.

Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

Zolang consumenten deze rauwe vleeswaren consumeren is er noodzaak om, naast voorlichting over de risico's, voedsel te produceren dat zo veilig mogelijk is. De hoge humane ziektelast van T. gondii maakt het noodzakelijk dat er maatregelen worden genomen om T. gondii infecties in mensen te voorkomen.

Op dit moment zijn er in de vleessector twee bewegingen gaande die het risico op T. gondii in rauwe vleeswaren mogelijk vergroten. Ten eerste is er naast de huidige veehouderij een beweging gaande richting verduurzaming hiervan en die het naar buiten gaan van landbouwhuisdieren stimuleert. Meer buitenloop betekent echter meer risico op een T. gondii besmetting. T. gondii komt voor in het milieu en bijvoorbeeld in de biologisch varkenshouderij komen meer T. gondii infecties voor dan bij varkens die altijd binnen worden gehouden. Ten tweede wordt ernaar gestreefd minder zout in voedingsmiddelen te gebruiken, terwijl juist zout effectief is bij het afdoden van T. gondii. Om die reden is het belangrijk te bepalen hoeveel zout minimaal nodig is.

De resultaten van dit project zullen verder inzicht geven in de optimale concentratie zout die toegevoegd moeten worden om veilige rauwe vleeswaren te produceren. Daarnaast beogen wij dat een potentieel proefdiervrij alternatief voor het aantonen van levende T. gondii in besmet vlees getest kan worden zodat deze de traditionele dierexperimenten voor dit doel kunnen vervangen. Op deze wijze kan er zonder het gebruik van proefdieren het effect van zout en andere toevoegingen op de levensvatbaarheid (of doden) van T. gondii getest worden.

VOORSPELDE SCHADE

In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.

Schape:

- Selectie van een schapebedrijf waar geen T. gondii infecties voorkomen door uitvragen van de abortushistorie, vaststellen of er T. gondii vaccinatie wordt toegepast, afwezigheid van (jonge) katten en geen antilichamen tegen T. gondii in bloed van 10 schape van dit bedrijf. Van 10 schape zal bloed worden afgenomen om vast te stellen of ze ooit een T. gondii infectie hebben doorgemaakt. Alleen wanneer alle 10 schape negatief getest worden dan kunnen deze schape gebruikt worden voor dit project. De afname duurt maximaal 5 minuten.
- 5 geteste schape worden experimenteel besmet met T. gondii door middel van een toediening via de mond. De toediening duurt maximaal 5 minuten
- Bij de 5 schape wordt gedurende 20 weken maximaal 13 keer bloed afgenomen. Een afname duurt maximaal 5 minuten
- Bij de 5 schape wordt gedurende de eerste 2 weken maximaal 7 keer temperatuur gemeten. Een meting duurt maximaal 5 minuten.
- Schape worden aan het einde van het experiment verdoofd en daarna gedood in een steriele sectieruimte om het geïnfecteerde vlees te verkrijgen. Het onder verdoving brengen duurt maximaal 5 minuten.

Muizen:

- Het experiment start met een eenmalige bloedafname van alle dieren. De afname duurt maximaal 1 minuut.
- Daarna wordt via een injectie in de buikholte T. gondii besmet weefsel toegediend (verkregen uit het schapeexperiment). Deze handeling duurt maximaal 1 minuut.
- Dieren worden 42 dagen lang één tot drie keer per dag beoordeeld op klinische symptomen van de besmetting. Deze observaties worden gedaan door de muizen in hun kooi te bekijken. In enkele gevallen worden muizen uit de kooi genomen om ze beter te kunnen bekijken. Deze handeling duurt maximaal 1 minuut.
- Op dag 42, of eerder als de muizen te ziek zijn geworden van de infectie, worden de muizen verdoofd en daarna gedood. Hersenen worden verzameld om te onderzoeken op T. gondii. Mochten de muizen doodgaan in de eerste twee weken, dan wordt ook nog het buikvocht verzameld en onderzocht op T. gondii. Het aantonen van T. gondii in de hersenen of buikvocht duidt op de aanwezigheid van levende en daarom infectieuze T. gondii.

Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?

Zowel de schape als de muizen zullen licht ongerief ondervinden van de handelingen die hierboven zijn beschreven.

De verwachting is dat de schape niet of amper ziek zullen worden na de orale T. gondii infectie. Desondanks worden de dieren dagelijks geobserveerd op mogelijke klinische symptomen zoals ademhalingsproblemen. Als de dieren koorts hebben dan zullen ze koortswerend middel krijgen om het ongerief te verlichten.

Een deel van de muizen kunnen in de eerste drie dagen na de toediening van T. gondii weefsel een buikvliesontsteking ontwikkelen als gevolg van een bacteriële infectie afkomstig uit het toegediende weefsel. Muizen kunnen daarnaast tot ± 2 weken na de toediening van T. gondii weefsel ziek worden als gevolg van deze infectie met als belangrijkste verschijnselen koorts, algehele malaise en vocht in de buikholte. Door de muizen in die periode zeer intensief te observeren met behulp van een experiment-specifieke-klinische-scoringsmethode worden te zieke dieren vroegtijdig uit het experiment genomen en gedood. Dieren krijgen de eerste dagen na infectie drinkwater met pijnstilling om het ongerief van de infectie te verminderen.

Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?

Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad			
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig
Schape (Ovis aries)	10	0	0	10	0
Muizen (Mus musculus)	143	0	0	130	13

Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?

Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren		
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd
Schapen (<i>Ovis aries</i>)	0	5	0

Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.

5 schapen zullen worden gedood om *T. gondii* besmet vlees te verkrijgen
 143 muizen zullen gedood worden om in hersenen en in sommige gevallen in het buikvocht vast te stellen of de muis een *T. gondii* infectie heeft doorgemaakt.

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

Schape: Schape zijn nodig om geïnfecteerd vlees te verkrijgen voor de experimenten en kunnen niet worden vervangen. In de laatste sectie van de NTS (keuze van de diersoort) wordt dit uitgelegd.

Muis: Een belangrijk deel van dit project is het vervangen van de muizen experimenten om levende T. gondii aan te tonen in vlees.

In het vorige project is een celweek ontwikkeld die na optimalisatie de muizen experimenten zou kunnen vervangen. Om dit vast te stellen zullen de muizenexperimenten en de celweek eerst met elkaar vergeleken moeten worden. Dit is één van de doelstellingen van dit project. Als de T. gondii detectie met de celweek vergelijkbare resultaten oplevert als de uitkomsten uit de muizenexperimenten dan kan de celweek als proefdiervrij alternatief dienen voor toekomstige projecten met T. gondii.

2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Schape: De eerste stap is om vast te stellen of het schape infectiemodel werkt. Hiervoor worden twee schape gebruikt. Als dit niet blijkt te werken dan zullen wij de geplande experimenten met de overige drie schape niet uitvoeren. Door deze strategie worden zo min mogelijk schape gebruikt.

Muis: Op basis van de resultaten van onze vorige studie was het mogelijk om een betere berekening te maken van het benodigde aantal muizen voor dit experiment. Doordat zowel de resultaten uit de celweek als de resultaten uit de muisproef worden gebruikt om het effect van zout te bepalen zijn minder bepalingen met de muisproef nodig.

3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

Schape: Er mogen geen T. gondii infecties zijn op het bedrijf waar de schape aanvankelijk gehuisvest zijn. Om vast te stellen welke schape geschikt zijn voor dit project zullen we één bloedafname doen die plaatsvindt op de boerderij waar de dieren gehuisvest zijn. Wanneer alle schape negatief getest worden op T. gondii, dan is het bedrijf geschikt en kunnen de geteste schape gebruikt worden. Schape, afkomstig van een bedrijf dat niet geschikt is zullen niet onnodig worden vervoerd en blootgesteld aan andere experimentele handelingen.

Muis: Bij de muizenexperimenten hebben we in onze vorige studie gezien dat muizen tot en met de eerste twee weken snel ziek kunnen worden. We hebben op basis van die ervaring onze experiment-specifieke-klinische-scoringsmethode aangepast. Dit betekent dat we de dieren intensiever monitoren, namelijk van twee naar drie keer per dag gedurende de meest kritische periode (de eerste twee weken). We verwachten dat door deze aanpassingen het humane eindpunt voor zieke muizen nog beter kan worden toegepast.

Zowel bij de muizen als bij de schape zal pijnstilling of een ontstekingsremmend middel worden toegediend om mogelijke ongerief van de infectie te verlichten.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

Schape: In het voorgaande project is getracht geïnfecteerd vlees te verkrijgen door middel van slachthuis materiaal (schape harten). Schape werden geselecteerd omdat bekend is dat de besmettingsgraad van T. gondii bij schape hoog is. Uit dit materiaal was echter niet genoeg besmet vlees met voldoende levende T. gondii parasieten te verkrijgen voor verder onderzoek. Om deze reden worden in dit project 5 schape experimenteel geïnfecteerd. Schape worden gemakkelijk

geïnficeerd met *T. gondii*. Op grond van literatuur is de verwachting dat de concentratie bij deze experimenteel geïnficeerde dieren hoog genoeg zal zijn.

Muizen: In deze studie is het van belang om het effect van zout en andere toevoegingen op de levensvatbaarheid van *T. gondii* te bepalen. Hierbij dient een onderscheid gemaakt te worden tussen levende en dode *T. gondii*. Er is dus een test nodig waarmee levende *T. gondii* kan worden aangetoond. Daar wordt de muis voor gebruikt. Dit is de 'gouden standaard' en de enige internationaal aanvaarde methode voor het bepalen van de aanwezigheid van levende *T. gondii* in vlees.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	30-09-2027
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	ja
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: donderdag 10 juni 2021 15:14
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: Verzoek om advies over projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202115002
Bijlagen: 2021.D_0014_DAP.pdf; 210526_NTS_Toxoplasma_os.xlsx; 2021.D_0014_PP.pdf; 2021.D_0014_PV_tek_os.pdf

Geachte leden van 5.1 lid2h

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening advies te geven over het project met als titel: "Verbetering voedselveiligheid door (1) ontwikkeling en validatie van de celkweek voor aantonen van levende Toxoplasma gondii parasieten in vlees als alternatief voor de muisbioassay en (2) bepalen van het effect van zout en andere toevoegingen in rauwe vleeswaren op T. gondii hiermee" en aanvraagnummer: AVD 5.1 lid2h 202115002.

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 10-06-2021, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommekeer per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 10-06-2021 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
 Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
 Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Geachte CCD,
Onderstaand het advies dat de **5.1 lid2h** geeft aangaande het onderstaande project.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD** **5.1 lid2h** **202115002**
2. Titel van het project: Verbetering voedselveiligheid door (1) ontwikkeling en validatie van de celkweek voor aantonen van levende Toxoplasma gondii parasieten in vlees als alternatief voor de muisbioassay en (2) bepalen van het effect van zout en andere toevoegingen in rauwe vleeswaren op T. gondii hiermee
3. Titel van de NTS: Bepalen van het effect van zout en andere toevoegingen in rauwe vleeswaren op Toxoplasmose gondii met een nieuwe proefdiervrije methode
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
5.1 lid2h
Secretaris: **5.1 lid2h**
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 10-06-2021
Aanvraag compleet: 10-06-2021
In vergadering besproken: 14-06-2021 en 12-07-2021
Termijnonderbreking(en) van 23-06-21 tot 30-06-2021
Besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen: n.v.t.
Aanpassing aanvraag: 30-06-2021
Advies aan CCD: 20-07-2021
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
8. Eventueel horen van aanvrager
n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager
Datum vragen: 23-06-2021
Gestelde vragen *en antwoorden*:
 - Het is een mooi streven om een dierproefvrij alternatief te ontwikkelen. Bij uw eerder ingediende project dat niet vergund is heeft de DEC u gevraagd te onderbouwen waarom de celkweek, die eerder onvoldoende sensitief was, nu wel voldoende sensitief zou kunnen zijn. Daarop heeft u toen antwoord gegeven. Deze onderbouwing ziet de DEC ook graag in het nu voorliggende project terug.
Op blz 7 en 8 van het projectvoorstel onder kop "Resultaten voorgaande studie" hebben wij gepoogd helder samen te vatten welke opbrengsten de vorige vergunning heeft opgeleverd. Eén van de opbrengsten was dat celkweek hoopgevend was als alternatief voor de muisbioassay en dat doorontwikkeling mogelijk was met enkele optimalisaties als onderdeel van dit projectvoorstel.

De sensitiviteit is nog niet bekend, deze gaan we stapsgewijs bepalen door eerst bepalingen te doen in gespiked vlees (subdoel 1 in het project proposal op blz 14/18) en daarna in experimenteel geïnfecteerd vlees (subdoel 4 in het project proposal op blz 14/18).

- De DEC is niet overtuigd dat schapen infecteren met toxoplasma noodzakelijk is. De harten uit slachthuizen bleken voorheen niet bruikbaar; de DEC wil weten of er nog andere manieren te overwegen zijn om aan het benodigde weefsel te komen.

Uit deze vraag begrijpen we dat het voor de DEC voldoende duidelijk is dat geen gebruik gemaakt kan worden van schapenharten uit het slachthuis. U vraagt hier om andere manieren. Uit een vraag hieronder blijkt dat u ook kweekvlees overweegt. Het antwoord op uw vraag is dat geïnfecteerd rundvlees het meest gewenst is. Maar geïnfecteerd rundvlees is zowel natuurlijk als experimenteel onvoldoende betrouwbaar te verkrijgen (zie paragraaf 3.4.2 project proposal). Andere consumptiedieren die wel gemakkelijk te infecteren zijn, zijn schaap, geit, varken en kip. De kleine herkauwers zijn wat vleesstructuur betreft het meest vergelijkbaar met het rund. Wanneer voor natuurlijk geïnfecteerde dieren in het slachthuis wordt gekozen heb je bij schapen de grootste kans een positief dier te treffen (50% seroprevalentie bij schapen, vs. 11% in geiten en 2% in varkens en vrijwel niet bij conventioneel gehouden vleeskuikens). Om die reden is in het vorige project voor schaap gekozen en heeft het nu de voorkeur om met schaap verder te gaan.

- U heeft een vorige keer al ondervonden dat het toevoegen van parasieten aan vlees waar het niet in zit, niet kan worden gebruikt voor het optimaliseren van de celkweek methode en voor het testen van inactiverende vleesbewerkingsmethoden. Er wordt helaas niet geschreven waarom niet. Kunt u dit nader toelichten? Deze vraag heeft de DEC u bij het eerdere project ook gesteld en u heeft daar toen op geantwoord. Een onderbouwing zou ook nu toegevoegd moeten worden.

In bijlage 1 (DAP schapen onder G, replacement, punt 2, blz 10/22) staat beschreven waarom toevoegen van parasieten geen goed alternatief voor de experimentele infectie in schapen is. In deze tekst geven we ondermeer aan dat weefselcysten die na infectie op een natuurlijke wijze in het vlees aanwezig zijn (intracellulair in de spiercellen) anders op de additieven reageren dan vrije weefselcysten die aan gemalen vlees worden toegevoegd. Voor het behalen van de doelstelling (vergroting T. gondii voedselveiligheid) is het van belang zo dicht mogelijk bij de werkelijke situatie te blijven en geïnfecteerd vlees te gebruiken.

We willen hier graag bij opmerken dat de consequentie kan zijn dat wanneer het niet lukt om via een experimentele infectie T. gondii positief vlees te verkrijgen, het project stopt. Dergelijk vlees beschouwen we als cruciaal voor dit project (zie paragraaf 3.4.1 van het project proposal bij subdoel 2 op blz 14/18).

- U vermeldt dat de celkweekmethode binnen dit project wordt opgezet en toegepast voor het testen van procesmaatregelen en dat verdere optimalisatie van de celkweekmethode nog nodig is voordat deze toegepast kan worden in de praktijk. U schrijft ook dat in de toekomst bredere toepassing denkbaar is, al blijft de celkweekmethode (net als de muisbioassay) te bewerkelijk voor routinematige toepassing. Kunt u nader toelichten welke bredere toepassing van de T. gondii celkweekmethode in de toekomst in de praktijk kan ontstaan?

De celkweek kan de muisbioassay vervangen. In het kader van de T. gondii voedselveiligheid van vlees wordt de muisbioassay gebruikt voor: Referentietest voor de validatie van diagnostische testen (PCR, ELISA).

Pathogenese en prevalentie studies om na te gaan welke dieren en welke organen van dieren geïnfecteerd zijn met T. gondii. Hierbij wordt soms eerst gebruik gemaakt van serologie of PCR, maar wordt muisbioassay gebruikt om te bepalen of de aanwezigheid van antilichamen of parasitair DNA ook betekent dat er infectieuze T. gondii aanwezig is.

Inactivatiestudies van T. gondii in vlees, zoals de studie die wij willen uitvoeren. In deze studie onderzoeken we het effect van zout, lactaat en acetaat. Echter, hier houdt het onderzoek niet mee op. Er kunnen ook andere toevoegingen (andere

conserveringszouten of bijvoorbeeld specerijen en saus) en bewerkingen (drogen, roken, vriezen, verhitten, fermenteren) onderzocht worden met de muisbioassay.

Bij al deze toepassingen kan een celkweek de muisbioassay vervangen. Daarnaast is het mogelijk dat de muisbioassay op kleinere schaal wordt gebruikt omdat de celkweek al een heel aantal antwoorden geeft. In dat geval is er dus een vermindering in plaats van een complete vervanging. Bovendien is het mogelijk om met een celkweek meer variaties te onderzoeken dan met een muisbioassay kan gebeuren. Een muisbioassay is altijd beperkend in het aantal monsters. Afrondend kan gezegd worden dat er veel perspectief is voor de celkweekmethode.

Deze reactie hebben we toegevoegd aan paragraaf 3.4.2 van het project proposal (blz 16/18) onder het kopje 'Perspectief van de celkweekmethode'.

- Als de celkweekmethode alleen wordt opgezet om de effectiviteit van vleesbewerkingsmethoden proefdier-vrij te onderzoeken, dan zou de muisbioassay kunnen volstaan. Op welke manier is deze onderzoeksstrategie precies proefdier-besparend?

Dit project is de weg naar vervanging van de muisbioassay voor T. gondii. Enerzijds wordt de vervanging onderzocht (zie hoofddoelstelling 2, paragraaf 3.2.1, project proposal).

Anderzijds is voor de geteste procesmaatregelen in dit project (zie hoofddoelstelling 1, paragraaf 3.2.1, project proposal) de muisassay deels nog nodig, maar kan door de celkweek informatie het aantal dieren wel verminderd worden.

Het doel is na dit project testen van procesmaatregelen zonder muisbioassay uit te kunnen voeren.

Als we deze vraag toch niet goed hebben begrepen dan hopen wij dat de DEC ons in de gelegenheid stelt dit mondeling toe te lichten.

- Waarom gaat u er vanuit dat alle 16 inactivatieprocessen ook in de muizen getest moeten worden?

Het aantal van 16 inactivatieprocessen staat niet in beton gegoten. Procesmaatregelen waarvan uit de celkweek duidelijk is dat niet alle T. gondii wordt afgedood hoeven niet herhaald hoeven te worden in de muisbioassay. Deze aanpak kan er toe leiden dat er minder procesmaatregelen worden getest in de muisbioassay of dat er een andere zoutconcentratie gekozen wordt. Zie voor details subdoel 3 in paragraaf 3.4.1 van het project proposal.

In bijlage 2 met de DAP over de muisbioassay wekken we de indruk dat de 16 procesmaatregelen zoals benoemd in het project proposal allemaal getest zullen worden in de muisbioassay. Om die indruk weg te nemen hebben we de tekst over de muisbioassay in bijlage 2, onderdeel A3 (blz 16/22) in bovengenoemde zin aangepast.

- Heeft de toevoeging van zout, natriumacetaat of natriumlactaat effect op de celcultuur? Doordat er een vleesdigestie en enkele wasstappen aan vooraf gaan, komen deze toevoegingen komen slechts in lage concentraties in de celkweek terecht en er is geen effect hiervan op de celcultuur.
- Het verbaast de DEC dat de detectielimiet van de muisbioassay nog niet bekend is, terwijl deze wordt gezien als de gouden standaard. Kunt u toelichten waarom de detectiegrens nog moet worden bepaald?

Inderdaad is er kennis over de detectielimiet van de muisbioassay. Een voorbeeld daarvan is een publicatie van Guo et al., 2016, waarnaar verwezen wordt in bijlage 2 (DAP muisbioassay onder A). Echter, uit de literatuur is ook duidelijk dat de detectielimiet kan verschillen, onder andere door verschillen in virulentie van de gebruikte T. gondii stammen en de gevoeligheid van de gebruikte muizen voor een T. gondii infectie. Er is geen vaste waarde die onder alle omstandigheden geldig is. Ons hoofddoel is niet het bepalen van de detectielimiet van de muisbioassay, maar de vergelijking tussen de detectielimiet van muisbioassay en celkweek. Voor een dergelijke test dienen zowel de celkweek als de muisbioassay parallel aan elkaar uitgevoerd te worden met hetzelfde uitgangsmateriaal. Pas dan kan op een verantwoorde wijze een conclusie getrokken worden over de detectielimiet in de muisbioassay en in de celkweek.

De informatie uit Guo et al., 2016 heeft ons geholpen om de reeks te bepalen die we willen testen. Het gaat hier om een range van 10 tot 10.000 bradyzoieten. Daarnaast is het voornemen om ook de invloed van vleesdigestie op de detectielimiet te bepalen.

Deze tekst hebben we toegevoegd aan de beschrijving van de strategie in 3.4.2 van het project proposal onder het kopje 'Detectielimiet van de muisbioassay' (blz 16/18).

- Als de detectielimiet van de celkweekmethode hoger ligt dan die van de muis-assay wat is dan het vervolg?

Aan het einde van het project (zie subdoel 4 op blz 14/18 van het project proposal) wordt de detectielimiet van de celkweekmethode en van de muisbioassay in parallel bepaald. We gaan er vanuit dat uw vraag betrekking heeft op deze vergelijking.

Ons antwoord op deze vraag is dat, mocht de detectielimiet van de celkweekmethode veel hoger zijn dan de muisbioassay dat we in dat geval geen mogelijkheden zien voor vervanging van de muisbioassay door de celkweek. De beoordeling van de procesmaatregelen zal dan alleen op basis van de muisbioassay worden gedaan.

Op basis van de uitkomsten van de vorige vergunning verwachten we dat hier geen sprake van zal zijn omdat toen bleek dat de sensitiviteit op tachyzoieten in de celkweek en in de muisbioassay vergelijkbaar was. In dit project willen we de sensitiviteit vergelijken van bradyzoieten.

- Als er na vleesbewerking nog levende bradyzoieten worden gedetecteerd in de celkweekmethode, wordt die bewerkingsmethode dan ook nog in muizen getest? Ziet u hier mogelijkheden voor vermindering en verfijning?

*Voor ons ligt de beantwoording van deze vraag in lijn met het antwoord op vraag e. Procesmaatregelen waarvoor uit de celkweek duidelijk is dat niet alle *T. gondii* wordt afgedood hoeven niet herhaald hoeven te worden in de muisbioassay. Deze aanpak kan er toe leiden dat er minder procesmaatregelen worden getest in de muisbioassay of dat er een andere zoutconcentratie gekozen wordt. Het zijn juist de vleesmonsters waar de muizen eventueel nog erg ziek van kunnen worden die op deze manier komen te vervallen. We hebben deze aanpak beschreven onder subdoel 3 in paragraaf 3.4.1 van het project proposal.*

*Aan verfijning in bijlage 2 onder G hebben we de volgende zin toegevoegd: "De procesmaatregelen waarvoor uit de celkweek blijkt dat ze weinig effect hebben op de overleving van *T. gondii* vervallen of worden vervangen."*

- Mocht daadwerkelijk geïnfecteerd vlees nodig zijn, zijn er dan geen mogelijkheden op het gebied van kweekvlees?

*Dit is een interessante opmerking en zou een mooie oplossing zijn. Echter, kweekvlees lijkt ons voor dit *T. gondii* onderzoek niet haalbaar. Voor het testen van de procesmaatregelen is geïnfecteerd vlees nodig waarin *T. gondii* op een natuurlijke wijze weefselcysten heeft gevormd. We zien niet hoe in een kweekvleessituatie weefselcysten op een natuurlijke wijze in dit vlees komen en verwachten dat het effect van procesmaatregelen heel anders uit kan pakken dan in een natuurlijke situatie. Wij brengen graag de tekst onder "Levenscyclus *T. gondii*" in het projectvoorstel onder de aandacht die het verloop van de *T. gondii* uit legt.*

- U wil bepalen in welke mate verschillende zouten *T. gondii* afdoden en infecties kunnen voorkomen. Hiertoe kijkt u naar een range van zoutconcentraties, tot wel 3.0%.

*Hoe rechtvaardigt u dergelijke hoge zoutconcentraties als we in Nederland – en elders – toch in een trend zitten naar minder zout in ons eten, vanwege gezondheidsredenen. Mocht de hoogste zoutconcentratie de sterkste reductie in *T. gondii* geven, hoe realistisch is het dat een dergelijk receptuur ook daadwerkelijk gebruikt kan gaan worden in de praktijk?*

Het klopt dat de levensmiddelenindustrie werkt aan verlaging van zout in voeding, ook in vleeswaren.

Bij het opstellen van de 16 procesmaatregelen is gebruik gemaakt van de huidige recepturen van vier bij dit project betrokken vleeswarenfabrikanten. De zoutreeks is in overleg met hen vastgesteld.

*In filet americain is de zoutconcentratie meestal tussen 1,2 en 1,8%, maar kan ook 2,5% zijn. Vanuit literatuur is bekend dat 2 % zout *T. gondii* afdood. Dus een zoutconcentratie van 3% zou zeker effectief moeten zijn. Een volledig effectieve zoutconcentratie is een belangrijke controle in de experimenten en nodig voor de modellering van het effect van zout.*

*We wijzen er op dat dit project van waarde is voor de vleeswarenindustrie omdat duidelijk wordt hoeveel zout er nodig is om *T. gondii* in rauwe vleeswaren af te doden. Juist in het licht van de trend naar vermindering van zout is onderdosering een risico en moet overdosering worden voorkomen.*

Deze tekst hebben we toegevoegd aan de beschrijving van de strategie in 3.4.2 van het project proposal (blz 16/18) onder het kopje 'Lijst met procesmaatregelen'.

- Kunt u meer in het algemeen aangeven wat de range van veelbelovende zoutconcentraties is als dit vergeleken wordt met wat nu de praktijk is, en in het licht van de trend naar minder zout in ons eten?

Wij modelleren de effectiviteit van NaCl binnen de range van 0.6% en 3.0% NaCl. Het gaat om een dosis-responsmodel waarbij voor iedere zoutconcentratie binnen die range het % overleving wordt geschat (o.b.v. geïnfecteerde muizen en geïnfecteerde celkweek flesjes) en we verwachten dat 3% NaCl volledig effectief is.

Wat betreft de zoutconcentraties in de praktijk is er een convenant productverbetering afgesloten tussen de overheid (VWS) en de levensmiddelenindustrie (FNLI). Hierin zijn inspanningen afgesproken om het zoutgehalte en het verzadigd vetgehalte van een groot aantal producten stapsgewijs te verlagen. Er is een wetenschappelijke adviescommissie samengesteld die het akkoord verbetering productsamenstelling begeleidt.

<https://www.akkoordverbeteringproductsamenstelling.nl/organisatie/wetenschappelijke-adviescommissie>. Jaarlijks heeft de NVWA en het RIVM onderzoek uitgevoerd naar de voortgang.

*In een NVWA rapport uit 2016 (Monitoring van het gehalte aan keukenzout in diverse levensmiddelen) staat beschreven wat het gemiddelde zoutgehalte (bepaling van gehalte natrium * 2,5) is in 960 bemonsterde en gemeten vleeswaren, nl 1,28 gram zout per 100 gram. De laagst gemeten waarde was 0,03 gram zout per 100 gram, de hoogst gemeten waarde 7,93 gram zout per 100 gram product. Deze gemeten waarden van 2016 zijn 10 % lager dan gemeten in 2011, de trend gaat de goede kant op.*

In het met de overheid afgesloten convenant zijn de "rauwe" gezouten vleeswaren in verband met voedselveiligheid uitgesloten van het programma om het zoutgehalte te verlagen. Producten zoals runderrookvlees, paardenrookvlees, bressola, rauwe ham, ontbijtspek zijn niet veilig te produceren en te bewaren met een zoutgehalte onder de 3%. Deze producten hebben een zoutgehalte uiteenlopend van 3,5% tot 5%. Deze tekst hebben we toegevoegd aan de beschrijving van de strategie in 3.4.2 van het project proposal (blz 17/18) onder het kopje 'Zout in vleeswaren'.
- Op 16/16 staan de tabellen met zoutconcentraties. Waarom zijn er verdeeld over de twee series, drie groepen met 1,2% NaCl? Kan de groep 1,2% NaCl uit serie 1 niet gebruikt worden ter vergelijking binnen serie 2, zodat deze zoutconcentratie niet (of slechts eenmaal in plaats van tweemaal) herhaald hoeft te worden?

Er zijn inderdaad drie groepen met 1.2% NaCl, verdeeld over twee series. Het antwoord op uw vraag is als volgt.

Serie 1 gebeurt op de ene dag en serie 2 op de volgende dag. Praktisch gezien is het onhaalbaar om beide series op één dag te doen, daarom is het verdeeld. Verder dient er rekening gehouden te worden met variaties per dag omdat het startmateriaal kan verschillen. Om die reden willen we graag de complete serie van zoutconcentraties testen op dag 1 en er niet één tussen uit halen om daar de resultaten van een andere dag bij in te voegen, zoals u voorstelt.

Tot slot willen we opmerken dat in serie 2 wordt nagegaan wat het additionele effect is van lactaat en acetaat aan de inactivatie met zout op T. gondii. Zout is waarschijnlijk het meest belangrijk voor inactivatie maar van lactaat en acetaat wordt verwacht dat deze ook een effect hebben. Om dit goed te testen voeren we die bepalingen in duplo uit. En daarbij is dus ook 1.2% zout nodig, anders is het niet mogelijk om het additionele effect van lactaat en acetaat te bepalen.

Deze tekst hebben we toegevoegd aan de beschrijving van de strategie in 3.4.2 van het project proposal (blz 17/18) onder het kopje 'Lijst met procesmaatregelen'.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

- N.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project vergunningplichtig is (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag is een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over de aanvraag te adviseren vanuit het oogpunt van onafhankelijkheid, onpartijdigheid en beschikbare expertises.

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Dit project is een vervolg op een eerder project waarbij 3 methoden werden getest op de detectie van levende T. gondii parasieten. De celkweek bleek de meest veelbelovende om vervolgstudies mee uit te voeren.
2. De DEC heeft geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort, gesignaleerd die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan.
3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. De directe doelen van de aanvraag zijn:
 - Optimaliseren van de celkweek
 - Een diermodel opzetten om onder experimentele omstandigheden voldoende T. gondii besmet weefsel te verkrijgen.
 - Met het verkregen T. gondii besmette vlees, nagaan welke concentraties van zout en andere additieven T. gondii inactiveren en daarmee de vleeswaren veiliger maken. Deze tests worden in eerste instantie uitgevoerd met behulp van celkweek.
 - Confirmatie van de resultaten verkregen met de celkweek (subdoel 3) met de muisbioassay. De muisbioassay is de 'gouden standaard'. De resultaten van afdoding van T. gondii door procesmaatregelen zal getest worden in de celkweek en vergeleken worden met de muisbioassay.

De uiteindelijke doelen van de aanvraag zijn:

- Het vergroten van de voedselveiligheid door beheersing van T. gondii risico's in rauwe vleeswaren. Dit doel wordt bereikt door het effect van huidige procesmaatregelen (o.a. het toevoegen van zout) op de bereiding van rauwe vleeswaren te bepalen en zo nodig verder te optimaliseren.
- De traditionele muisbioassay vervangen door een proefdier-vrij alternatief, namelijk de celkweek methode, zodat procesmaatregelen voor de bereiding van vleeswaren in het laboratorium getest kunnen worden en dit niet meer hoeft in een dier.

De DEC heeft, bij meerderheid van stemmen, vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen de directe en uiteindelijke doelstellingen en dat de directe doelen gerechtvaardigd zijn binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belanghebbenden en hun morele waarden in het project zijn:
 - De *proefdieren* hebben een nadeel doordat zij geïnfecteerd en doodgemaakt moeten worden in het kader van het project. Echter, wanneer in de toekomst geen muizenbioassay ter detectie van levende parasieten in vlees meer nodig hebben is dit in het belang van de toekomstige proefdieren.
 - De onderzoekers/onderzoeksinstituten hebben een kennisbelang bij het vergaderen van kennis en een economisch belang omdat dit onderzoek in opdracht wordt uitgevoerd
 - De vleeswarenssector heeft er belang bij dat zij veilige producten tegen een lage kostprijs aan de consument kan verkopen
 - De maatschappij/consument heeft er belang bij dat zij er zeker van kan zijn dat zij veilige vleesproducten kan consumeren
 - De overheid kan met de resultaten van dit onderzoek mogelijk beleid/regelgeving maken aangaande het testen van vleesproducten.
6. Voor zover de DEC dat kan inschatten is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, mede afgaande op het geschreven projectvoorstel en het al ervaring hebben op dit onderzoeksgebied voldoende is gewaarborgd. Verder is er een breed samenwerkingsverband met de vleeswarenssector en andere belanghebbende instellingen.
8. Een meerderheid van de DEC is van mening dat, na beantwoording van de eerdere vragen en aanpassing van het project, het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. Enkele leden van de DEC hebben hun bedenkingen uitgesproken. Het DEC advies is dan ook geen unaniem advies. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in de ogen van de meerderheid van de DEC-leden leiden tot het behalen van de doelstelling(en) binnen het kader van het project.
Eén lid van de DEC vindt de toepasbaarheid niet duidelijk. Het celkweekstelsel kan straks worden gebruikt om de effectiviteit van andere vleesbewerkingsmethoden te onderzoeken. Het

is niet duidelijk of het celkweekstelsel ook breder inzetbaar is in de praktijk: de pathogenese van *T. gondii* is al uitgebreid bestudeerd, en voor routinematig gebruik is de celkweekmethode niet geschikt zoals de onderzoeker eerder heeft vermeld. .

Een ander DEC-lid weet niet waarom men wil testen met 3% zout als vanuit de literatuur bekend is dat 2% al voldoende is om *T. gondii* te doden. Ga je hier niet onnodig dieren voor inzetten en waarvoor? Wat is de noodzaak voor 2,4, 2,7 en 3%? In de DEC wordt vervolgens opgemerkt dat de concentraties en aantallen groepen nog niet geheel vast staan. De onderzoeker geeft daar echter geen vervolg aan. Men zou verwachten dat er dan go/no go's geformuleerd zouden zijn wanneer men wel of niet gaat testen in muizen, te meer daar de onderzoeker aangeeft dat men de dierproeven zoveel mogelijk wil verminderen.

Een derde DEC-lid kan uit het voorstel niet opmaken of het nu om de ontwikkeling van een diermodel gaat of om een infectie-experiment. Als het doel is: de ontwikkeling van een diermodel is (een diermodel opzetten om onder experimentele omstandigheden voldoende *T. gondii* besmet weefsel te verkrijgen.), vraagt dit DEC-lid zich af of dat doel met de huidige opzet bereikt kan worden. Op basis van de huidige opzet, komt men in de ogen van dit DEC-lid niet tot een diermodel.

Ook is dit DEC-lid van mening dat wanneer de onderzoeker schrijft dat "*hartweefsel van schapen onvoldoende geschikt was omdat het aantal weefselcysten te laag was en niet homogeen verdeeld was maar ook dat van schapenharten uit het slachthuis niet bekend is of het geïnfecteerd was met T. gondii en hoe hoog de concentratie van bradyzoieten was*" dit perspectief biedt. Bloed van schapen kan dan serologisch onderzocht worden en aangezien schapen vaak een paar dagen afhangen in het slachthuis zouden de positief gebleken karkassen alsnog gebruikt kunnen worden. Dit DEC-lid vraagt zich ook af waarom gekozen is voor 20 weken oude lammeren terwijl de meeste klinische verschijnselen bij (drachtige) eersteworpsoorten wordt gezien.

Welzijn dieren

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn): dit geldt voor de schapen
De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd; er zijn geen schapen speciaal gefokt voor dierproeven beschikbaar.
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Echter, bij de muizen ontbreekt of de dieren in groepen of individueel gehuisvest worden. Bij de schapen is niet vermeld dat de dieren in eerste instantie op het bedrijf van herkomst worden bemonsterd.
11. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "matig" realistisch is ingeschat en geclassificeerd voor een groot deel van de dieren. Ca. 10% van de muizen gaat echter dood voor een HEP toegepast kan worden door het snelle verloop van de aandoening, met name door buikvliesontsteking door geïnfecteerd proefmateriaal. Deze dieren ondergaan in de ogen van de DEC ernstig ongerief. Ongerief in de experimenten zal voor de schapen bestaan uit: orale toediening, maximaal 14x bloedafname, temperatuurmeting, euthanasie en de stress die hanteren t.b.v. voornoemde handelingen met zich meebrengt. De muizen hebben ongerief in de experimenten door: 1-malige bloedafname, intraperitoneale toediening van besmet weefsel, ziekteverschijnselen van *T. gondii*, euthanasie en stress van het hanteren t.b.v. voornoemde handelingen.
12. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier anders dan als gevolg van de proefbehandelingen. De integriteit van de dieren wordt aangetast door het doden van de dieren en bij de muizen door het inspuiten van besmet materiaal waardoor de dieren ziek worden.
13. De DEC heeft vastgesteld dat de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en dat goed is ingeschat welk percentage van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken. In beide bijlagen zijn HEP's gedefinieerd. Op basis van ervaring in eerdere projecten kan gezegd worden dat minder dan 1% van de schapen een HEP zal bereiken en dat tot 68% van de muizen een HEP bereikt. De criteria voor de HEP's zijn duidelijk toepasbaar en de frequentiecontrole is geoptimaliseerd n.a.v. een vorig project.

3 V's

14. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Er wordt in dit projectvoorstel gepoogd om proefdiergebruik in de toekomst te vervangen door een celkweekmethode ter detectie van levende *T. gondii* parasieten in rauw vlees of vleesproducten.
Een van de DEC-leden merkt op dat de onderzoekers de muizenassay in het verleden al hebben

gebruikt. Waarom er nu (weer?) een dosistitratie uitgevoerd moet worden in de muizen is voor dit DEC-lid onvoldoende duidelijk gemaakt .

In de vergadering is gediscussieerd dat het in het onderzoek niet om numerieke waarden zoals titer gaat maar dat men onder dezelfde omstandigheden een muisbioassay wil vergelijken met een celkweekmethode. Dan is het de vraag waarom je een dosis-titratie zou willen doen. Het is een aantal DEC-leden verder niet duidelijk of er nu wel of niet een gestandaardiseerde muisassay is en of die nu alleen voor het eigen lab is. En hoe is dan de vergelijking met andere labs?

15. DEC heeft vastgesteld dat dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Het aantal te gebruiken dieren is mede ingeschat op basis van eerder onderzoek.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. Mede door het gebruik van HEP's kan het ongerief van de dieren zo veel mogelijk beperkt blijven tot matig. Eerder onderzoek heeft doen besluiten de controlefrequentie te intensiveren in een bepaalde periode. Hoewel niet van invloed op de cumulatieve mate van ongerief vraagt de DEC zich af of er volstaan kan worden met minder bloedafnames bij de schapen aangezien het daar toch enkel gaat om het verkrijgen van positief vlees? De DEC vindt dat dat met minder bloedafnames vastgesteld kan worden. De motivatie om wekelijks bloed af te nemen, ten behoeve van serologisch onderzoek, is niet duidelijk. Wanneer men bijvoorbeeld de duur van het experiment zou willen verkorten, door de dieren te seceren zodra een voldoende hoge antistof titer is bereikt, dan zou de DEC dat kunnen begrijpen, maar dat is in dit project geen optie. In de ogen van de DEC zou dan 1 of 2 keer bloedafname voldoende moeten zijn. Vermindering van de bloedafnamemomenten zou een verfijning kunnen opleveren.
17. Er is geen sprake van wettelijk verplicht onderzoek; de vraag over duplicatie is niet van toepassing.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De dieren worden van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven.
19. De muizen worden gedood in het kader van het project omdat er weefsels verzameld moeten worden. Dat geldt ook voor de helft van de te gebruiken schapen. De dieren worden gedood volgens een passende methode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. De helft van het aantal te gebruiken schapen kan terugkeren naar het bedrijf van herkomst.

NTS

21. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7. De titel van de NTS dekt in de ogen van de DEC echter niet de lading.

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag van het project is: Weegt het doel, nl. het pogen vergroten van de voedselveiligheid door beheersing van T. gondii risico's in rauwe vleeswaren door aanpassingen van procesmaatregelen (o.a. het toevoegen van zout) te onderzoeken en zo nodig te optimaliseren en de traditionele muisbioassay pogen te vervangen door een proefdier vrij alternatief, namelijk de celkweek methode, zodat procesmaatregelen voor de bereiding van vleeswaren in het laboratorium getest kunnen worden en dit niet meer hoeft in een dier, op tegen het maximaal matige ongerief (m.u.v. de dieren die dood gaan voor een HEP toegepast kan worden; die ondervinden ernstig ongerief) van maximaal 143 muizen en 10 schapen?
2. De meerderheid van de DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft in haar afweging meegewogen dat, wanneer het project zijn uiteindelijke doel haalt dit een bijdrage kan leveren het verminderen van proefdiergebruik t.b.v. toxoplasma-detectie.

De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade-baten-analyse:

- De onderzoekers hebben een reëel wetenschappelijk belang. Er is sprake van kennis vergaren. De DEC waardeert dit als een belang van beperkte morele waarde.
- De CRO heeft naast bovengenoemd reëel wetenschappelijk belang van beperkte morele waarde ook een economisch voordeel bij dit onderzoek omdat het in opdracht uitgevoerd wordt. De DEC waardeert dit als een belang van beperkte morele waarde.
- De vleeswarensector heeft er een economisch belang bij dat zij veilige producten, (tegen een zo laag mogelijke kostprijs) kunnen verkopen aan de consument. De meerderheid van de DEC waardeert dit als een reëel belang van beperkte morele waarde.
- De maatschappij/consument heeft een reëel gezondheidsbelang bij de wetenschap dat de vleesproducten die zij eten veilig zijn. De DEC waardeert dit als een belang van reële

- morele waarde.
 - De overheid heeft er een reëel belang bij wanneer zij door regelgeving beleid kan maken dat voedselveiligheid van vleesproducten voor de consument garandeert. De DEC waardeert dit als een belang van reële morele waarde.
 - Toekomstige proefdieren kunnen voordeel hebben wanneer er een dierproefvrij alternatief voor de huidige muisbioassay ontwikkeld wordt. De DEC waardeert dit als een reëel belang van grote morele waarde.
 - Tot slot zijn de waarden van de proefdieren in dit project in het geding. Zij ervaren grotendeels maximaal matig ongerief en voor ca. 10% ernstig ongerief als gevolg van de handelingen binnen het project. De integriteit van de proefdieren in dit project wordt niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef. De DEC waardeert het belang van de proefdieren als een reëel belang van grote morele waarde.
3. Op basis van bovenstaande overwegingen is de meerderheid van de DEC (7 van de 10 leden) van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar de ontwikkeling en validatie van de celkweek voor aantonen van levende Toxoplasma gondii parasieten in vlees als alternatief voor de muisbioassay en het bepalen van het effect van zout en andere toevoegingen in rauwe vleeswaren op T. gondii met maximaal matig ongerief voor maximaal 140 dieren en maximaal ernstig ongerief voor maximaal 13 muizen. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging en vermindering van het aantal dieren. De DEC ziet wel mogelijkheden op het terrein van verfijning van de aanvraag. Twee DEC-leden twijfelen aan de haalbaarheid van de doelstelling om reden zoals onder C.8 beschreven. Eén van deze twee DEC-leden heeft ook twijfels over de te testen procesmaatregelen. Dit DEC-lid is van mening dat al bekend is dat invriezen uiterst effectief is maar nauwelijks ingezet wordt omdat dit economisch niet rendabel is. Dit DEC-lid ziet het als een ethisch probleem dat nieuwe methoden enkel om economische redenen ontwikkeld worden. Eén van deze twee DEC-leden ziet niet als doel het ontwikkelen van een dierproefvrije methode en is van mening dat het hier gaat om het uitvoeren van een infectie-experiment. Een van de DEC-leden geeft aan dat hij niet kan inschatten hoe realistisch het is dat de weefselkweek gevoeliger wordt dan de muisbioassay en om die reden niet goed tot een ethische afweging kan komen. Voor een ander DEC-lid is het belangrijk dat er duidelijkheid komt over de te testen concentraties. Wanneer hier een bevredigend antwoord op komt kan dit DEC-lid tot een positief advies over gaan.

Samenvattend kan de centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden door 7 leden van de DEC. 3 leden van de DEC beantwoorden de centrale morele vraag op dit moment met "nee".

E. Advies

1. Advies aan de CCD:
 - De meerderheid (7/10) van de DEC adviseert de vergunning te verlenen maar zou graag zien dat vragen die bij de DEC-leden leven opgehelderd worden
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op meerderheid (7/10) van stemmen.
3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's zijn naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies anders dan hierboven weergegeven.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e
 Secretaris 5.1 lid2h



Centrale Commissie Dierproeven

Form

Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- | | | |
|-----|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 5.1 lid2h |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | 5.1 lid2h |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Verbetering voedselveiligheid door (1) ontwikkeling en validatie van de celkweek voor aantonen van levende Toxoplasma gondii parasieten in vlees als alternatief voor de muisbioassay en (2) bepalen van het effect van zout en andere toevoegingen in rauwe vleeswaren op T. gondii hiermee |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|--|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input type="checkbox"/> Basic Research |
| | | <input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research |
| | | <input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production |
| | | <input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare |
| | | <input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures |
| | | <input type="checkbox"/> Higher education or training |
| | | <input type="checkbox"/> Forensic enquiries |
| | | <input type="checkbox"/> Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures |

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.1.

Introductie

Dit project betreft onderzoek naar voedselveiligheid met betrekking tot de parasiet *Toxoplasma gondii*. Mensen kunnen geïnfecteerd worden met *T. gondii* door het eten van rauw of onvoldoende verhit vlees en dit project beoogt de risico's hiervan te verminderen.

Om de context van het projectvoorstel te duiden wordt in dit eerste deel algemene informatie gegeven over vleesconsumptie en vleesproductie. Verder wordt ook informatie gegeven over voedselveiligheidsrisico's in het algemeen en de beheersing van deze risico's.

Gezond en veilig vlees

De relatie tussen vleesconsumptie en een gezond en duurzaam voedingspatroon is een prominent onderwerp in het maatschappelijke debat. Er is onderzoek naar de invloed van vlees eten op gezondheid, duurzaamheid en klimaat. Ook worden er cijfers verzameld over vleesconsumptie, wordt er gekeken naar consumentengedrag en -voorkeuren en wordt onderzoek gedaan naar vleesvervangers en alternatieve eiwitbronnen.

Wanneer een consument vleeswaren (bewerkte producten van vlees) eet dienen deze veilig te zijn. Deze voedselveiligheid is de focus van dit voorstel en het betreft met name de voedselveiligheid gerelateerd aan de parasiet *T. gondii*, één van de ziekteverwekkers die door vlees wordt overgedragen op de mens.

Vleesconsumptie in Nederland

De gemiddelde Nederlander eet ruim 38 kilo vlees per jaar, ongeveer 11 kg daarvan wordt gegeten als vleeswaren. In de periode 2010 – 2015 was er sprake van een lichte daling van de vleesconsumptie, maar sinds 2018 is er weer een lichte stijging. Ongeveer de helft van de Nederlanders noemt zichzelf 'flexitariër'. Dat wil zeggen dat ze minimaal drie keer per week geen vlees bij de warme maaltijd eten. Het aandeel vegetariërs ligt stabiel op iets minder dan vijf procent van de Nederlandse bevolking (5.1 lid2h).

Deng et al., 2020 maakte op basis van gegevens van de Nederlandse Nationale Voedselconsumptiepeiling 2007–2010 een lijst van 83 van de meest gegeten producten van vlees. Deze lijst omvat 36 producten afkomstig van varkensvlees, 27 van rundvlees, 8 van kalfsvlees, 7 van lamsvlees, 2 van rundvlees / varkensvlees gemengd en 2 van schapenvlees. Verreweg de meeste producten van vlees op deze lijst worden verhit tijdens de bereiding. De lijst bevat 18 vleesproducten die niet verhit worden tijdens de productie en direct gegeten worden. Dit betreft 3 rundvlees, 13 varkensvlees en 2 rundvlees/varkensvlees gemengde producten van vlees waaronder bijvoorbeeld droge worsten, ham en filet americain (zie lijst in Deng et al., 2020).

Toelichting rauw gegeten vlees: dit vlees wordt in tegenstelling tot vers vlees bewerkt en worden er zout en andere additieven zoals natriumacetaat en natriumlactaat aan toegevoegd.

Vleesproductie in Nederland

Naast de voorziening voor eigen consumptie produceert Nederland jaarlijks veel vlees voor andere landen. Dit vlees wordt geëxporteerd naar meer dan 140 landen over de hele wereld. Verspreid over al die landen eten ruim 100 miljoen mensen vlees en vleeswaren die uit Nederland komen (Centrale Organisatie voor de Vleessector – COV; www.cov.nl).

Voedselveiligheidsrisico's (van voedsel en van vlees)

Het RIVM onderzoekt elk jaar de Nederlandse consumptie en bepaalt hoeveel mensen ziek worden of sterven aan 14 voedsel-gerelateerde ziekteverwekkers die via voedsel worden overgedragen: *Campylobacter* spp., STEC O157, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* toxine, *Clostridium perfringens* toxine, *Staphylococcus aureus* toxine, Norovirus, Rotavirus, Hepatitis A virus, Hepatitis E virus, *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *Toxoplasma gondii*. De 14 ziekteverwekkers kunnen niet alleen via voedsel in het lichaam van de mens terechtkomen. Het kan

ook via het milieu (bijvoorbeeld via oppervlaktewater), dieren, en van mens op mens. Het aandeel van deze routes verschilt per ziekteverwekker.

De ziektelast wordt uitgedrukt in DALY's (Disability Adjusted Life Year), een internationale maat voor het aantal gezonde levensjaren dat verloren gaat aan ziekte of voortijdig overlijden. Het totaal aantal DALY's die deze 14 ziekteverwekkers in 2019 veroorzaakten is 11.000 DALY's, dus 11.000 verloren levensjaren. Iets meer dan 1700 DALY's (15%) werd in verband gebracht met vlees (d.w.z. gevogelte, varkensvlees, rundvlees en lamsvlees) (Lagerweij et al., 2020).

Beheersen van voedselveiligheidsrisico's

Om de voedselveiligheid te vergroten wordt er veel aandacht besteed aan het veilig produceren van voedsel (inclusief vlees).

- De rijksoverheid heeft wetgeving opgesteld waar producenten van voedingsmiddelen aan moeten voldoen. Zo worden in de 'Wet dieren' eisen aan de microbiologische veiligheid van vlees en andere dierlijke producten gesteld en wordt in de 'Warenwet' van voedingsmiddelenbedrijven geëist dat deze moeten zorgen voor de veiligheid van voedsel; consumenten mogen er niet ziek van worden.
- Namens de overheid houdt de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA) hier toezicht op.
- Niet alleen de rijksoverheid stelt voorwaarden en houdt toezicht. Ook de sector zelf levert hier een bijdrage aan, zowel bij de primaire productie als bij de verwerking werkt ze aan bewustwording van producenten van voedselveiligheidsrisico's en stelt normen vast voor een veilige productie.
- Tot slot is ook voorlichting van de consument over mogelijke voedselveiligheidsrisico's van belang evenals voorlichting over de veilige bereiding van voedingsmiddelen.

Toxoplasma gondii

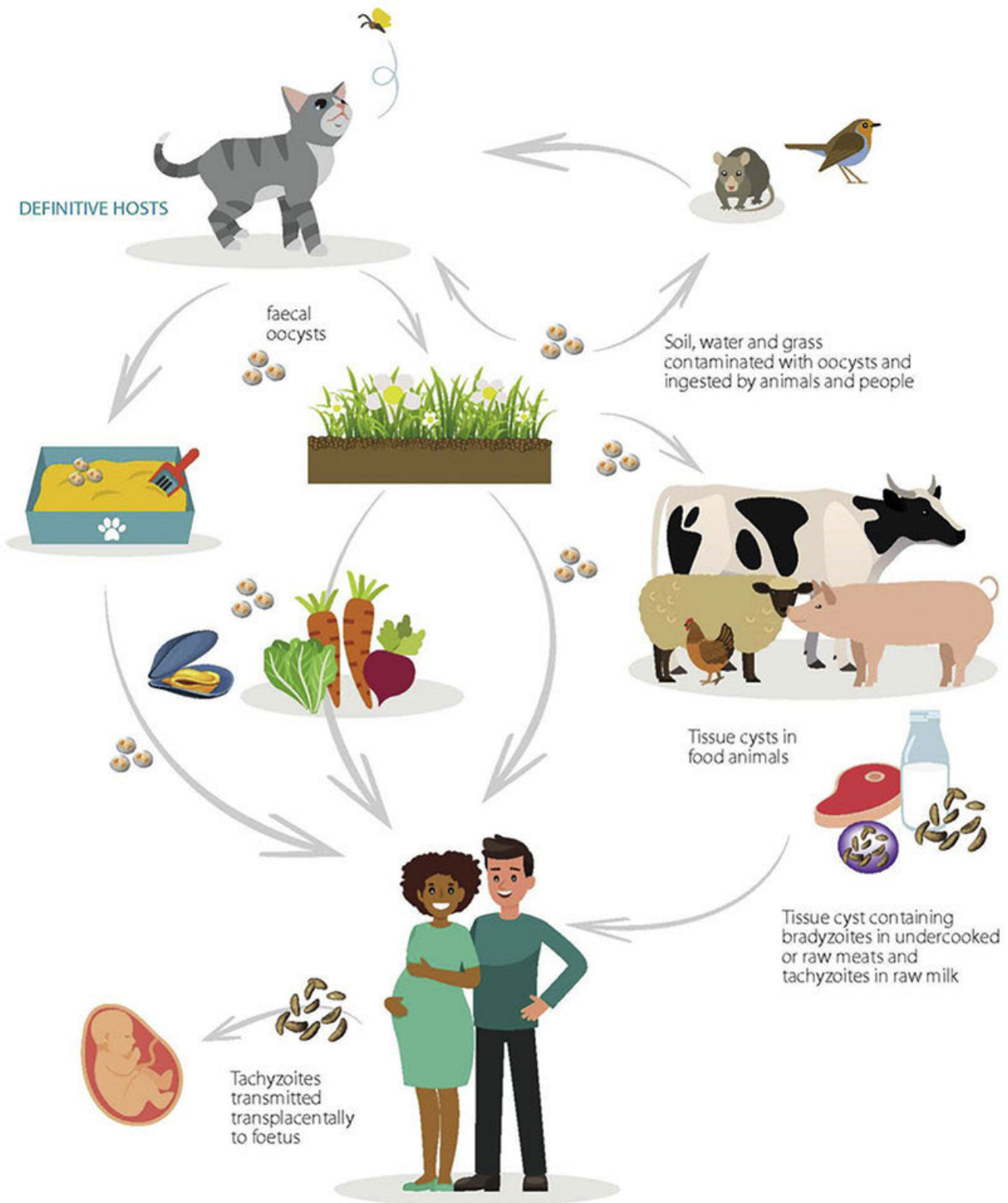
T. gondii is één van de meest voorkomende zoönotische parasieten ter wereld en vrijwel alle warmbloedige dieren, inclusief mensen, zoogdieren en vogels kunnen besmet worden door deze ziekteverwekker. *T. gondii* is de veroorzaker van toxoplasmose, een potentieel ernstige ziekte bij de mens die leidt tot een hoge humane ziektelast. Naar schatting is ongeveer een derde van de wereldbevolking geïnfecteerd met de parasiet (Tenter et al., 2000). Zwangere vrouwen en mensen met een verminderde immuniteit vormen de belangrijkste risicogroepen. Ook gezonde mensen kunnen geïnfecteerd worden, waarbij tijdelijke algemene ziekteverschijnselen als lymfklierzwellingen en koorts kunnen voorkomen en terugkerende ontstekingen in het oog (chorioretinitis) tot ernstige gezichtsstoornissen kunnen leiden.

Levenscyclus *T. gondii* (zie figuur 1)

T. gondii heeft een complexe levenscyclus met verschillende infectieuze stadia en meerdere gastheren. Er zijn drie infectieuze stadia van *T. gondii*: 1. tachyzoïeten in de bloedbaan, 2. bradyzoïeten in weefselcysten en 3. sporozoïeten in oöcysten (Dubey, 1998). De kat is de enige eindgastheer van de parasiet en de kat heeft daarom de belangrijkste rol bij de overdracht van *T. gondii*. Katten kunnen zichzelf infecteren door opname van één van de drie infectieuze stadia van *T. gondii* (Dubey, 2010). Vervolgens kunnen ze miljoenen oöcysten via de ontlasting uitscheiden in het milieu (Dubey et al., 2010). Uitscheiding van oöcysten kan tot ongeveer 20 dagen aanhouden (Dubey, 2010). Oöcysten sporuleren binnen enkele dagen in het milieu en kunnen gedurende meer dan een jaar infectieus blijven in de bodem of het water. Een breed scala aan warmbloedige dieren kan geïnfecteerd raken door opname van gesporuleerde oöcysten uit besmette omgeving en kunnen dus dienen als tussengastheer van de parasiet (Dubey, 1998). Na opname van oöcysten door een tussengastheer (bijv mens of dier) worden sporozoïeten vrijgemaakt in de darm van deze tussengastheer. De sporozoïeten dringen de darmcellen in en worden daar omgezet in tachyzoïeten. Tachyzoïeten worden snel via de bloedstroom naar alle weefsels verspreid. In de weefsels worden weefselcysten gevormd met daarin tot wel 3000 bradyzoïeten per weefselcyste. Weefselcysten kunnen zich 7-10 dagen na infectie vormen en blijven leven in meerdere organen, het spierweefsel en de spieren van het centrale zenuwstelsel. Aangenomen wordt dat weefselcysten levensvatbaar blijven gedurende het leven van de gastheer. Als de kat een geïnfecteerde tussengastheer opneemt (bijvoorbeeld knaagdieren of vogels), is de cyclus van *T. gondii* voltooid. In tegenstelling tot de kat als eindgastheer scheiden tussengastheren *T. gondii* niet uit via de ontlasting, maar dierlijke

tussengastheren kunnen de infectie wel overdragen aan de mens door het eten van het vlees van die dieren.

FOODBORNE TRANSMISSION PATHWAYS FOR *TOXOPLASMA GONDII*



LEGEND



Figur 1: levenscyclus *Toxoplasma gondii*

Infectie routes - Milieu en vlees

Er zijn twee routes waarlangs *T. gondii* mensen kan infecteren. Dat is via het milieu, door bijvoorbeeld tuinieren of door het eten van rauwe groenten, besmet met oöcysten afkomstig uit de ontlasting van de kat. De andere route is via vlees, door het eten van rauw of onvoldoende verhit vlees of vleesproducten van geïnfecteerde dieren, besmet met weefselcysten. In Nederland wordt geschat dat 56% van de *T. gondii* infecties in de mens is toe te schrijven aan voedsel (o.a. vlees) en 36% aan contact met oöcysten in het milieu (o.a. water en grond) (Havelaar et al., 2008). Dit projectvoorstel is van toepassing op de risico's op *T. gondii* infecties in de mens via de vleesroute met als doel de voedselveiligheid te verbeteren.

Humane ziektelast van *T. gondii*

T. gondii wordt nationaal en internationaal erkend als een belangrijke voedselpathogeen, de humane ziektelast is hoog. Dit blijkt uit de resultaten van de volgende studies:

- Als tijdens de zwangerschap een infectie van de moeder met *T. gondii* optreedt, dan kunnen de tachyzoïeten de placenta passeren en het ongeborn kind infecteren. Dit leidt tot aangeboren toxoplasmose (Dunn et al., 1999). Het grootste deel van de ziektelast die gepaard gaat met infectie met *T. gondii* bij de mens is te wijten aan aangeboren toxoplasmose. In 2013 werd de jaarlijkse wereldwijde incidentie van aangeboren toxoplasmose geschat op 190.100 gevallen (1,5 per 1000 levendgeborenen), en de last van aangeboren toxoplasmose werd geschat op 1,2 miljoen DALY's (Torgerson en Mastroiacovo, 2013).
- In 2015 stond *T. gondii* op de vierde plaats van 24 door voedsel overgedragen parasieten wereldwijd (WHO, 2015).
- In de jaarlijkse vergelijking van de ziektelast van 14 voedseloverdraagbare ziekteverwekkers staat de ziektelast door congenitale en oog (oculaire) toxoplasmose in Nederland op de tweede plaats na *Campylobacter* (Lagerweij et al., 2020).
- In Europa, stond *T. gondii* op de tweede plaats van een ranglijst van 23 door voedsel overgedragen parasieten waarin rekening werd gehouden met de volksgezondheid, de handel en het sociaal economische belang (Bouwknegt et al., 2018).

Huidige strategieën voor preventie *T. gondii* risico's

Bovenstaande lijst geeft de impact van *T. gondii* op zowel nationale als internationale schaal duidelijk weer, daarom zijn in Nederland de volgende preventie strategieën van toepassing:

- Voorlichting van de risicogroepen (zwangere vrouwen en mensen met verminderde weerstand) wordt als belangrijk gezien. Bij deze voorlichting gaat het niet alleen om het vermijden van rauwe (rund)vleesproducten, maar ook om bijvoorbeeld hygiënemaatregelen bij het tuinieren. Verder geldt voor de algemene bevolking het advies vlees goed te verhitten.
- Voor (vlees)producten die doorgaans rauw gegeten worden zoals filet americain, geldt in het algemeen dat invriezen van het vlees waarmee de producten worden gemaakt een goede methode is om *T. gondii* te doden. Invriezen kent echter ook beperkingen. Het is in veel gevallen niet wenselijk vanwege overmatig vochtverlies, invriezen heeft een negatief effect op de kwaliteit (verkleuring) en levert bezwaren op bij afnemers (structuurverlies en hogere kosten). Verder kosten faciliteiten voor invriezen en ontdooien geld en energie. Bovendien zijn er voedselveiligheidsrisico's verbonden aan ontdooien van vlees. Wanneer het vlees niet gelijkmatig (alleen aan de buitenkant en niet in de kern) ontdooid dan kunnen er ongewenste bacteriën groeien in het vlees.
- De NVWA houdt bij producenten toezicht op de aanwezigheid van een voedselveiligheidsplan en controleert specifiek of *T. gondii* daarin is opgenomen als relevant gevaar.
- Andere preventieve benaderingen zijn het vergroten van de bioveiligheid bij het produceren van vlees. Maatregelen als bestrijding van knaagdieren, katten uit de buurt houden van boerderij / strooisel / opslag en zorgen voor schoon drinkwater op varkensbedrijven worden over het algemeen genomen voor dieren die binnen worden gehouden, maar deze maatregelen zijn onvoldoende voor dieren met buitenuitloop omdat *T. gondii* in het milieu voorkomt.
- Voor schapen is er een vaccin, dit wordt gebruikt om abortus als gevolg van *T. gondii* te voorkomen. Voor de overige landbouwhuisdieren is er geen vaccin.
- Er is geen commercieel verkrijgbaar vaccin voor gebruik bij katten en mensen. Bovendien, gebaseerd op wiskundige modellen is een hoge vaccinatiegraad voor katten nodig om het aantal menselijke infecties te verminderen. Een hoge dekking wordt als onhaalbaar beschouwd voor grote kattenpopulaties (Bonačić Marinović et al., 2019).

Samenvattend kan gezegd worden dat strategieën zijn ontwikkeld voor beheersing van *T. gondii* voedselveiligheidsrisico's. Echter, dit is nog niet effectief genoeg want de humane ziektelast voor *T.*

gondii is nog steeds hoog in Nederland en daarbuiten. Dit vraagt om een uitbreiding van de huidige preventieve maatregelen.

T. gondii risico's van rauwe vleeswaren

Uit onderzoek blijkt dat T. gondii voedselveiligheidsrisico's verbonden zijn aan het eten van vlees en met name van rauw gegeten vleeswaren.

- Uit een studie onder zwangere vrouwen in Europa bleek dat tussen 30% en 63% van de infecties konden worden toegeschreven aan consumptie van rauw of onvoldoende verhit vlees en vleesproducten (Cook et al., 2000).
 - Om het relatieve belang van de verschillende rauwe vleesproducten in kaart te brengen heeft het RIVM een QMRA-model (kwantitatieve microbiologische risicobeoordeling) ontwikkeld (Opsteegh et al. 2011). In dit model wordt op basis van het vóórkomen van T. gondii infectie bij de verschillende diersoorten, de afdoding door bereiding en de consumptiegegevens, voor ieder vleesproduct het aantal humane infecties voorspeld. Uit dit model blijkt dat 41% van de voorspelde infecties is toe te schrijven aan onverhitte vleesproducten (cervelaat, salami, filet américain, runderrookvlees, Suçuk droge Turkse worst, bacon, ontbijtspek, rauwe ham en theeworst). Doordat er slechts beperkt gegevens beschikbaar waren over de afdoding van T. gondii bij de bereiding van de vleesproducten zijn om die reden alleen de processtappen vriezen, verhitten en zouten opgenomen in het model. Het is zeer waarschijnlijk dat methodes als roken, zuren, fermenteren en het gebruik van andere additieven ook effect heeft op de levensvatbaarheid van T. gondii, en dus is het aantal voorspelde infecties voor bepaalde producten waarschijnlijk overschat.
 - In 2020 werd het QMRA model aangepast en opnieuw werd het relatieve belang uitgerekend (Deng et al., 2020). Resultaten tonen aan dat rundvlees de belangrijkste bron blijft, aangezien het 84% bijdroeg aan het totale aantal voorspelde besmettingen onder de Nederlandse bevolking, gevolgd door varkensvlees (12%), schapenvlees (3,7%), lamsvlees (0,2%) gemengd varkensvlees / rundvlees producten (0,1%) en kalfsvlees (0,01%). Op productniveau droeg alleen filet américain bij aan 80% van de totale voorspelde infecties in het basismodel, maar scenario analyses tonen aan dat de bijdrage ervan sterk afhankelijk is van de hoeveelheid zout die gebruikt wordt bij de bereiding van rauwe vleeswaren. Om die reden is het belangrijk dat de effecten van zouten en andere toevoegingen aan rauwe vleeswaren worden geëvalueerd.
- Samenvattend kan gezegd worden dat er T. gondii voedselveiligheidsrisico's zijn verbonden aan het eten van rauwe vleeswaren. Nader onderzoek is nodig naar de veiligheid van deze producten en met name is er antwoord nodig op de vraag of T. gondii afgedood in rauwe vleeswaren tijdens de bereiding of dat er een aanpassing van de receptuur nodig is.

Huidige mogelijkheden voor detectie van T. gondii parasieten

Voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag naar afdoding van T. gondii in rauwe vleeswaren tijdens de bereiding hiervan is een detectiemethode nodig. Deze methode moet in staat zijn om levende T. gondii parasieten aan te tonen. De meeste diagnostische testen (zoals serologie en PCR) maken geen verschil tussen dode en levende T. gondii parasieten. De bioassay in muizen is de enige methode waarmee dit wel kan. Hieronder wordt dit verder toegelicht.

- Detectie van T. gondii infecties met PCR: Voor diagnostiek van T. gondii infecties wordt een qPCR techniek gebruikt om het genetisch materiaal van de parasiet aan te tonen. De gevoeligheid van deze qPCR is soms te laag om weefselcysten aan te tonen in geïnfecteerde dieren. De reden hiervoor is dat het aantal weefselcysten laag kan zijn in geïnfecteerde dieren en daarom zijn er methodes ontworpen om een grotere hoeveelheid vleesmonster te testen, zodat de kans om een weefselcyste te vinden groter wordt. De magnetic-capture qPCR (MC-qPCR) is daar een voorbeeld van, hiermee kan één weefselcyste in 100 gram vlees worden aangetoond.
- Detectie van T. gondii infecties met serologie: Voor diagnostiek worden ook serologische testen gebruikt waarmee de antilichaamrespons tegen T. gondii (en niet de parasiet zelf) wordt aangetoond bij het dier. Uit onderzoek van Opsteegh et al., (2016) bleek dat voor varkens, kleine herkauwers en kippen serologie kan helpen om het risico voor de consument te bepalen, maar serologie is minder van waarde voor andere diersoorten zoals paarden en rundvee.
- Detectie van levende T. gondii met de muis bioassay: Met de PCR wordt T. gondii DNA aangetoond. Dit geeft echter geen indicatie over de aanwezigheid van levende T. gondii, er wordt slechts de aanwezigheid van genetisch materiaal van T. gondii aangetoond. Voor diagnostiek van T. gondii infecties is in het algemeen de PCR vaak voldoende. Echter, voor sommige vraagstellingen kan het van belang zijn om wél onderscheid te maken tussen levende en dode T. gondii. Bijvoorbeeld in studies (zoals deze) om het effect van zout op de levensvatbaarheid van T. gondii te

bepalen. In dat geval is een test nodig waarmee levende T. gondii kan worden aangetoond. Daar wordt de muisbioassay voor gebruikt. Dit is een internationaal aanvaarde gouden standaard voor het bepalen van de aanwezigheid van levend T. gondii. Voor het uitvoeren van de muisbioassay wordt het vlees (50-200 gram) in het laboratorium klein gesneden en met enzymen verteerd. Het weefseldigest (materiaal wat overblijft na vertering) wordt (intraperitoneaal of subcutaan) ingespoten in muizen. Na inoculatie worden de muizen gemonitord op klinische verschijnselen. Als de muizen ziek worden en doodgaan of geëuthanaseerd worden dan worden de hersenen of de buikvloeistof microscopisch of met de PCR onderzocht op T. gondii. Bloed wordt serologisch onderzocht op antilichamen. Op dit moment is de muisbioassay de enige methode waarmee onderzocht kan worden of vlees(producten) levende T. gondii bevatten of niet. Echter, de muisbioassay heeft als grootste beperking dat er levende muizen geïnoculeerd, ziek en doodgemaakt moeten worden voor de detectie. Vanuit ethisch oogpunt is dit detectiemodel ongeschikt om te gebruiken. Bovendien is deze assay duur en de uitvoerbaarheid complex. Samenvattend kan gezegd worden dat voor de onderzoeksvraag naar afdoding van T. gondii in rauwe vleeswaren tijdens de bereiding hiervan een detectiemethode nodig is. Deze methode moet in staat zijn om levende T. gondii parasieten aan te tonen. Zoals hierboven omschreven is de PCR hiervoor geen geschikte techniek en zou de muisbioassay nodig zijn. Echter, de muisbioassay is een dierproef en om ethische redenen ongewenst. Om afdoding van levende T. gondii te kunnen testen is er binnen dit project ruimte ingericht om een alternatieve proefdiervrije in vitro methode te ontwikkelen om de muisbioassay hiermee te kunnen vervangen.

Resultaten voorgaande studie

Deze aanvraag voor een projectvergunning is een vervolg op een eerdere projectvergunning. De titel van dat voorstel was "Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassay" (AVD5.1 lid2h). Het resultaat van dit werk is opgeschreven in een publicatie (Opsteegh et al., 2020). De resultaten van het eerste project zijn als basis gebruikt voor de strategie van dit vervolgproject.

De strategie van AVD5.1 lid2h bestond uit twee delen:

1. Eerst werden drie in vitro methoden voor detectie van levende T. gondii opgezet. Dit betroffen:

- celkweekmethode
- Real Time Viability (RTV) assay
- propidium monoazide-PCR (PMA-PCR).

Uit de resultaten bleek dat de PMA-methode onvoldoende specifiek was, ook dode T. gondii bleken toch nog detecteerbaar met deze PCR methode. De RTV-methode bleek niet geschikt om geïnfecteerd vlees mee te testen. De celkweekmethode bleek het meest geschikt te zijn.

2. Net als in dit project was één van de doelen om het muizenassay te vervangen door een in vitro methodiek. De gevoeligheid van de celkweekmethode en de muisbioassay werden met elkaar vergeleken. Daarnaast werd met beide methoden gekeken naar het effect van toevoegingen van zout, natriumlactaat en natriumacetaat op de levensvatbaarheid van T. gondii. Daarvoor werd (in grote lijnen) de werkwijze gevolgd om filet americain (één van de rauwe vleeswaren met een hoog risico op T. gondii) te maken in het laboratorium en bij de bereiding verschillende concentraties van zout, natriumacetaat en -lactaat te gebruiken.

Om het "filet-americain product" te maken werden herten van serologisch positieve schapen uit het slachthuis verzameld en dit vlees werd gemalen. Het hart is een voorkeursplaats voor een T. gondii infectie en de kans is dus het grootst op T. gondii positief weefsel als het hart gebruikt wordt. De herten afkomstig uit het slachthuis bleken onvoldoende bradyzoieten te bevatten om als model voor T. gondii geïnfecteerde vleeswaren gebruikt te worden.

In een tweede serie werden daarom extra T. gondii weefselcysten aan de herten toegevoegd. Met behulp van celkweek waren de effecten van de toevoegingen van zout, natriumacetaat en natriumlactaat in dit experiment niet te beoordelen, maar in de muisbioassay (in 58 muizen) bleek een grote maar onvolledige vermindering van het aantal geïnfecteerde muizen. Geen van de geteste combinatie van zout, natriumlactaat en natriumacetaat leidde tot een 100% afdoding. Zout bleek het meeste effect te hebben op de levensvatbaarheid van T. gondii.

Samenvattend kunnen de conclusies van dit project als volgt geduid worden:

- Uit de resultaten van de muisbioassay blijkt dat geen enkele geteste combinatie van zout, natriumlactaat en natriumacetaat tot een 100% afdoding leidde. Zout bleek de belangrijkste component voor afdoding van *T. gondii*. Verder testen en verdere optimalisaties zijn nodig om te bepalen bij welke concentraties van zout en andere additieven *T. gondii* wordt geïnactiveerd en de vleeswaren veiliger worden.
- Het hartweefsel van schapen uit het slachthuis bleek onvoldoende geschikt omdat het aantal weefselcysten te laag was en niet homogeen genoeg verdeeld was over het vlees. Slechts een deel van de serologisch positieve schapen was ook positief in de PCR. Extra spiking (toevoegen) met weefselcysten bleek nodig.
- De resultaten van de celkweek zijn hoopgevend voor de ontwikkeling van een alternatief voor de muisbioassay. Echter, verdere optimalisatie van de celkweekmethode is nog nodig voordat deze toegepast kan worden in de praktijk.

Literatuurlijst

- Bouwknegt, M.; Devleeschauwer, B.; Graham, H.; Robertson, L.; Giessen, J.; Lassen, B. Prioritisation of food-Borne Parasites in Europe, 2016. *Eurosurveillance* 2018, 23, doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.9.17-00161.
- Cook, A.J., Gilbert, R.E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P.A., Foulon, W., Semprini, A.E., Dunn, D.T. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *European Research Network on Congenital Toxoplasmosis*. 2000 *Bmj* 321, 142-147.
- Deng H, Swart A, Bonačić Marinović AA, van der Giessen JWB, Opsteegh M. The effect of salting on *Toxoplasma gondii* viability evaluated and implemented in a quantitative risk assessment of meatborne human infection. *Int J Food Microbiol*. 2020 Feb 2;314:108380. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108380. Epub 2019 Oct 30. PMID: 31707174.
- Dunn, D., Wallon, M., Peyron, F., Petersen, E., Peckham, C., Gilbert, R., 1999, Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet* 353, 1829-1833.
- Dubey, J.P., 2010. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. Second edition. CRC Press; 2010 313 pages. ISBN 978-1-4200-9236-3.
- Mercedes Gomez-Samblas, Susana Vilchez, Rocío Ortega-Velázquez, Màrius V. Fuentes, Antonio Osuna, Absence of *Toxoplasma gondii* in 100% Iberian products from experimentally infected pigs cured following a specific traditional process, *Food Microbiology*, Volume 95, 2021, 103665, ISSN 0740-0020, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103665>.
- Gezondheidsraad. Richtlijnen goede voeding 2015. Publicatienr. 2015/24. Den Haag.
- Havelaar AH, Galindo AV, Kurowicka D, Cooke RM. Attribution of foodborne pathogens using structured expert elicitation. *Foodborne Pathog Dis*. 2008 Oct;5(5):649-59. doi: 10.1089/fpd.2008.0115. PMID: 18687052.
- Guo M, Mishra A, Buchanan RL, Dubey JP, Hill DE, Gamble HR, Jones JL, Du X, Pradhan AK. Development of Dose-Response Models to Predict the Relationship for Human *Toxoplasma gondii* Infection Associated with Meat Consumption. *Risk Anal*. 2016 May;36(5):926-38. doi: 10.1111/risa.12500. Epub 2015 Oct 19. PMID: 26477997
- Havelaar, A.H., Kirk, M.D., Torgerson, P.R., Gibb, H.J., Hald, T., Lake, R.J., Praet, N., Bellinger, D.C., de Silva, N.R., Gargouri, N., Speybroeck, N., Cawthorne, A., Mathers, C., Stein, C., Angulo, F.J., Devleeschauwer, B., 2015. World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. *PLoS Med* 12, e1001923.
- Havelaar, A H, Haagsma, J A, Mangen, M J, Kemmeren, J M, Verhoef, L P, Vijgen, S M, Wilson, M, Friesema, I H, Kortbeek, L M, van Duynhoven, Y T, van Pelt, W, 2012. Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009. *Int. J. Food Microbiol*. 156, 231-238.
- Kijlstra A, Eissen OA, Cornelissen J, Munniksma K, Eijck I, Kortbeek T. *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Sep;45(9):3165-9. doi: 10.1167/iovs.04-0326. PMID: 15326136.
- Lagerweij, G.R., Pijnacker, R., Friesema, I.H.M., Mughini Gras, L. and Franz, E. Disease burden of food-related pathogens in the Netherlands, 2019, RIVM letter report 2020-0117.
- Lindsay DS, Kaur T, Mitchell SM, Goodwin DG, Strobl J, Dubey JP. Buprenorphine does not affect acute murine toxoplasmosis and is recommended as an analgesic in *Toxoplasma gondii* studies in mice. *J Parasitol*. 2005 Dec;91(6):1488-90. doi: 10.1645/GE-732R.1. PMID: 16544426.
- **NVWA rapport. Monitoring van het gehalte aan keukenzout in diverse levensmiddelen. 2016**
- Opsteegh, M, Teunis, P, Mensink, M, Zuchner, L, Titilincu, A, Langelaar, M, Van der Giessen, J,

2010. Evaluation of ELISA test characteristics and estimation of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in Dutch sheep using mixture models. *Prev. Vet. Med.* 96, 232–240

-Opsteegh, M., Prickaerts, S., Frankena, K., Evers, E.G., 2011. A quantitative microbial risk assessment for meatborne *Toxoplasma gondii* infection in The Netherlands. *International journal of food microbiology* 150, 103-114.

-Opsteegh M, Dam-Deisz C, de Boer P, DeCraeye S, Faré A, Hengeveld P, Luiten R, Schares G, van Solt-Smits C, Verhaegen B, Verkleij T, van der Giessen J, Wisselink HJ. Methods to assess the effect of meat processing on viability of *Toxoplasma gondii*: towards replacement of mouse bioassay by in vitro testing. 2020 doi: 10.1016/j.ijpara.2020.04.001

-Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000;30:1217-58.

-Torgerson PR, Mastroiacovo P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bull World Health Organ.* 2013 Jul 1;91(7):501-8. doi: 10.2471/BLT.12.111732. Epub 2013 May 3. PMID: 23825877; PMCID: PMC3699792.

-World Health Organization (WHO) Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases 2015.

3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives
-

Hoofddoelstellingen

1. Het vergroten van de voedselveiligheid door beheersing van *T. gondii* risico's in rauwe vleeswaren. Dit doel wordt bereikt door het effect van huidige procesmaatregelen (o.a. het toevoegen van zout) op de bereiding van rauwe vleeswaren te bepalen en zo nodig verder te optimaliseren.

2. De traditionele muisbioassay wordt vervangen door een proefdiervrij alternatief, namelijk de celkweek methode, zodat procesmaatregelen voor de bereiding van vleeswaren in het laboratorium getest kunnen worden en dit niet meer hoeft in een dier.

Subdoelstellingen

1. Optimaliseren van de celkweek

2. Een diermodel opzetten om onder experimentele omstandigheden voldoende *T. gondii* besmet weefsel te verkrijgen.

3. Met het verkregen *T. gondii* vlees nagaan welke concentraties van zout en andere additieven *T. gondii* inactiveren en daarmee de vleeswaren veiliger maken. Deze tests worden in eerste instantie uitgevoerd met behulp van de celkweek.

4. Confirmatie van de resultaten verkregen met de celkweek (subdoel 3) met de muisbioassay. De muisbioassay is de 'gouden standaard'. De resultaten van afdoding van *T. gondii* door procesmaatregelen zal getest worden in de celkweek en vergeleken worden met de muisbioassay.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

Samenwerkingspartners

Dit project is een PPS (publiek private samenwerking) waarbij samengewerkt wordt tussen het bedrijfsleven en onderzoeksinstituten. De overheid financiert 50% van de kosten van dit onderzoek. Vanwege het belang van dit onderzoek voor de voedselveiligheid nemen deel en dragen financieel bij partijen uit de Nederlandse vleesverwerkende industrie. **Dat betreft twee vertegenwoordigende organisaties en vier verschillende producenten van vleeswaren. Daarnaast nemen vier onderzoeksinstituten deel.** Het is dus een studie voor en samen met de Nederlandse vleeswarenindustrie. De resultaten zullen gebruikt worden door de vleeswarenindustrie.

In de afgelopen jaren heeft de Nederlandse overheid (Ministerie van VWS) vragen gesteld aan de vleeswarenssector over de preventie van *T. gondii* risico's in rauwe vleeswaren. Dit was voor de sector mede aanleiding om het bovengenoemde PPS project te starten. Het plan voor dit project is bekend gemaakt aan de overheid en de vleeswarenssector zal de resultaten terug te koppelen naar de overheid.

Kennis en expertise

- **Kennisinstelling 1** is het kennis- en expertisecentrum van T. gondii infecties, dit betreft T. gondii infecties in mensen en in dieren. De kennis en expertise is inclusief ontwikkeling en toepassing van diagnostische testen voor T. gondii. Voor dit project vindt de ontwikkeling en de optimalisatie van de celweek plaats bij het RIVM. Er is ruime ervaring bij het RIVM met de celweek van T. gondii tachyzoieten en tijdens het vorige project is er ervaring opgedaan met de celweek van bradyzoieten.

- **Kennisinstelling 2** heeft ook veel kennis en expertise op het gebied van T. gondii. Daarnaast heeft **5.1 lid2h** de faciliteiten en kennis voor de uitvoering van dierproeven, ook met de muisbioassay voor T. gondii studies. De uitvoering van de dierproeven zal plaatsvinden bij **5.1 lid2h**

- **Kennisinstellingen 3 en 4** brengen vleestechnologische en microbiologische kennis en ervaring in om vleeswaren te kunnen produceren. Dit is inclusief kennis van vleeswaren die rauw geconsumeerd kunnen worden.

- Detailinformatie en kennis over de bereiding en recepturen van de rauwe vleeswaren is beschikbaar bij de vleeswarenbedrijven die betrokken zijn bij dit project.

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project? No Yes > Describe which laws and regulations apply and describe the effect on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

3.3 Relevance

3.3.1 What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

- T. gondii wordt nationaal en internationaal erkend als een belangrijke voedselpathogeen (zie sectie 3.1). De hoge humane ziektelast maakt het noodzakelijk dat er maatregelen worden genomen om T. gondii infecties te voorkomen.

- Ook wordt breed erkend dat beheersing van T. gondii risico's van rauw geconsumeerde vleesproducten gewenst is (zie ook sectie 3.1)

- Voor de vleeswarenssector is het urgent en belangrijk om te weten of de huidige procesmaatregelen voor de bereiding van rauwe vleeswaren, eventueel met kleine aanpassingen van de receptuur, voldoende zijn om het risico voor de consument te beheersen.

- De overheid neemt maatregelen om de veehouderij diervriendelijker en duurzamer te maken. Verduurzamen van de veehouderij betekent waarschijnlijk ruimte voor het natuurlijke gedrag van koeien, varkens en kippen en zorg voor hun specifieke behoeften en daarmee wordt buitenloop gestimuleerd. Meer buitenloop van dieren betekent meer risico op een T. gondii besmetting. T. gondii oöcysten komen voor in het milieu en bijvoorbeeld in de biologische varkenshouderij hebben varkens de mogelijkheid om buiten te lopen. Juist bij deze varkens komen meer T. gondii infecties voor (Kijlstra et al., 2004).

- Er is al meerdere jaren extra aandacht voor de hoeveelheid zout in voedingsmiddelen. De Gezondheidsraad beveelt aan om het gebruik in Nederland te beperken ter voorkoming of terugdringing van een hoge bloeddruk en ter vermindering van de kans op hart- en vaatziekten (Gezondheidsraad, 2015). Nederlandse vleeswarenproducenten werken aan het verder terugdringen van de zoutgehalten in hun producten. Dit project is van waarde voor de vleeswarenindustrie omdat duidelijk wordt hoeveel zout er nodig is om T. gondii in rauwe vleeswaren af te doden. De verworven kennis van dit project kan gebruikt worden om onder- of overdosering te voorkomen.

- Het risico van T. gondii in rauwe vleeswaren heeft de aandacht van de Nederlandse overheid, deze heeft vragen gesteld aan de vleeswarenssector over de preventie van T. gondii risico's in rauwe vleeswaren.

- De ontwikkeling van een in vitro methode als vervanging van de muisbioassay is voorwaardenscheppend voor de hoofddoelstelling, namelijk zorgen dat rauw geconsumeerde vleeswaren veiliger worden.

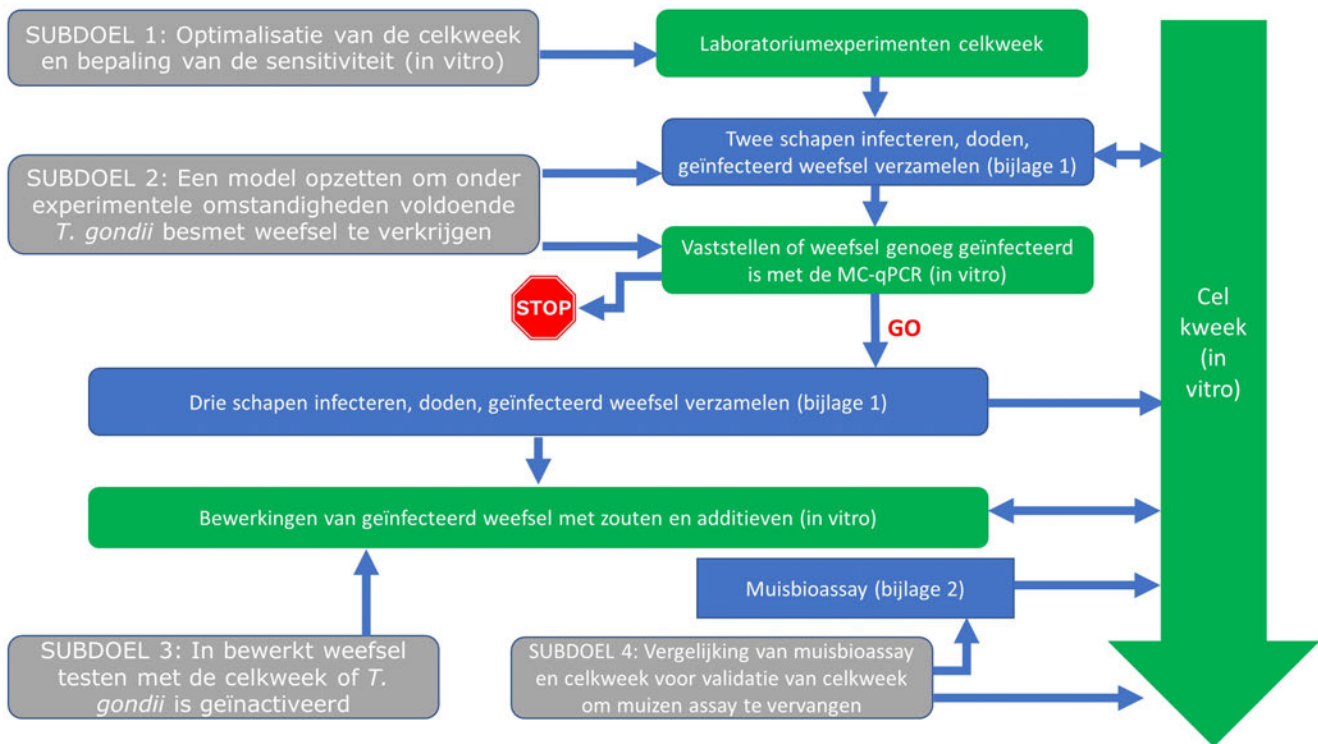
- De evaluatie van procesmaatregelen voor beheersing van T. gondii risico's in rauw gegeten vleeswaren en eventueel het aanpassen hiervan.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

- De vleeswarenssector (1): Het belang is om veilig voedsel van hoge kwaliteit te produceren.
- De vleeswarenssector (2): Producenten van rauwe vleesproducten hebben de verantwoordelijkheid om T. gondii voedselveiligheidsrisico's van rauwe vleeswaren te beheersen. Een belangrijk onderdeel van het verder bevorderen van de voedselveiligheid voor hen is een rekenmodel waaruit afgeleid kan worden welke procesmaatregelen effectief zijn voor het afdoden van T. gondii bij de bereiding van rauwe vleeswaren.
- Proefdieren: De ontwikkeling van de celkweek als alternatief voor de muisbioassay om levende T. gondii parasieten aan te tonen maakt het mogelijk voor de producenten om aanvullende testen uit te kunnen laten voeren zonder dat de muisbioassay nog nodig is.
- Landbouwhuisdieren: Beheersing van T. gondii risico's in de vleesproductieketen is op twee manieren mogelijk: 1) door de buitenloop van deze dieren te beperken en 2) door te zorgen voor een T. gondii veilige productie van vleeswaren. Vanuit dierenwelzijnsbelangen is beheersing van T. gondii risico's bij de productie van vleeswaren te prefereren.
- De wetenschap (1): Het belang is dat er nieuwe inzichten worden verworven over het beheersen van T. gondii risico's in rauwe vleeswaren.
- De wetenschap (2): Het belang is dat er een alternatieve test voor de muisbioassay ter beschikking komt. Dat de ontwikkeling van alternatieven voor de muisbioassay steeds meer urgent wordt blijkt bijvoorbeeld uit het sluiten van de kat assay faciliteit bij de USDA (<https://www.usda.gov/media/pressreleases/2019/04/02/ars-announcestoxoplasmosis-research-review-discontinues-research>).
- De wetenschap (3): Het belang is dat de resultaten van deze studie als input gebruikt kunnen worden voor de QMRA, die bij het RIVM is ontwikkeld. Op die manier kan opnieuw worden bepaald welke producten de grootste bijdrage leveren aan infecties in de bevolking.
- De consument: Het belang is veilig voedsel van hoge kwaliteit.
- De maatschappij (1): Het belang is vermindering van de ziektelast en kosten in de gezondheidszorg ten gevolge van T. gondii infecties.
- De maatschappij (2): Het belang is dat er een proefdiervrij alternatief voor de muisbioassay ter beschikking komt, wat vanuit ethisch oogpunt gewenst is.
- De overheid (1): Het belang is dat zij haar verantwoordelijk na kan komen om te zorgen voor voedselveiligheid.
- De overheid (2): De kennis die is opgedaan in dit project kan de overheid gebruiken om preventiestrategieën te bepalen.

3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.



Beschrijving subdoelen

- Onder 3.2.1 zijn 4 subdoelen beschreven. Hieronder worden ze verder uitgewerkt.
- Bij ieder subdoel zijn milestones (voorziene resultaten) beschreven. Deze milestones zijn nodig om het volgende onderdeel uit te kunnen voeren en de milestones dienen daarom behaald te worden voordat gestart kan worden met het volgende onderdeel.
- Alleen bij subdoel 2 is een go-nogo opgenomen. Bij dit subdoel is dit alleen relevant, bij de overige niet.

Subdoel 1: Optimalisatie van de celkweek en bepaling van de sensitiviteit (in vitro)

- In dit onderdeel wordt de celkweekmethode op de verschillende groeistadia van *T. gondii* (tachyzoieten, bradyzoieten) geoptimaliseerd en wordt de detectielimiet bepaald van de celkweek op tachyzoieten en bradyzoieten. Deze experimenten worden uitgevoerd met vlees van *T. gondii* negatieve dieren waar tachyzoieten of bradyzoieten aan toe worden gevoegd. Hiervoor zijn geen dierexperimenten noodzakelijk.
- Voor de uitvoer van dit onderdeel wordt gebruik gemaakt van de ervaring die is opgedaan in het eerste project. Toen bleek dat vooral schimmelvorming in de celkweek een probleem was. In dit in vitro onderdeel wordt getest hoe dit voorkomen kan worden. Ook zal nagegaan worden welk enzym het beste gebruikt kan worden voor digestie (vertering) van vlees.
- In dit in vitro deel wordt zowel de celkweek met tachyzoieten als met bradyzoieten uitgevoerd. De kweek met bradyzoieten is vooral relevant omdat dit het infectiestadium is van de parasiet die aangetoond dient te worden in vlees van de dieren. De kweek met tachyzoieten wordt uitgevoerd omdat er al veel ervaring is met de celkweek van dit infectiestadium.

Milestones:

- Een protocol voor digestie (vertering) van vlees
- Geoptimaliseerde protocollen voor celkweek van tachyzoieten en bradyzoieten
- Bepaling van sensitiviteit (detectielimiet) van de celkweek op tachyzoieten en bradyzoieten in gespiked vlees

Subdoel 2: Een diermodel opzetten om onder experimentele omstandigheden voldoende *T. gondii* besmet weefsel te verkrijgen.

- Ervaring met het slachthuismateriaal was dat er onvoldoende betrouwbaar positieve schapen konden worden verkregen en dat de concentratie van weefselcysten te laag was voor de experimenten met de procesmaatregelen.
- De verwachting is dat de concentratie weefselcysten in experimenteel geïnficeerde schapen

hoger is, in een experimentele studie is de infectiegraad beter te sturen en dat maakt de kans op succes groter.

- In de literatuur (Dubey, 2009) wordt vermeld dat de kans erg groot is dat een infectie aanslaat maar hoe hoog de concentratie is van T. gondii in het vlees en welke weefsels positief worden en vervolgens of dit voldoende is voor het uitvoeren van de experimenten met procesmaatregelen is niet duidelijk.
- Om die reden zullen twee schapen geïnfecteerd worden met T. gondii en zal bepaald worden met de MC-qPCR welke weefsels (hart, middenrif en meerdere spierweefsels) positief zijn. Vervolgens zal met de celkweek nagegaan worden wat de gevoeligheid is van de celkweek op dit materiaal. Om dit te bepalen zullen de resultaten van de MC-qPCR en de weefselkweek met elkaar vergeleken worden. Ook zal de qPCR uitgevoerd worden op digest wat in de weefselkweek gebruikt wordt om een goede indicatie te krijgen van de sensitiviteit van de celkweek.
- De infectie in de beide schapen zal serologisch vervolgd worden, daarvoor zullen bloedmonsters genomen worden van de schapen en getest worden op antilichamen tegen T. gondii. Een positieve serologie duidt op een succesvolle infectie. Alleen vlees van serologisch positieve schapen kan gebruikt worden voor uitvoeren van de verschillende procesmaatregelen.
- Na 10 weken zal euthanasie van de schapen plaatsvinden in de sectiezaal van 5.1 lid2h Het hart, middenrif en spiervlees zal worden klaargemaakt voor de experimenten in het laboratorium. Milestones: Uitvoering van MC-qPCR op hart, middenrif en spiervlees en bepaling sensitiviteit van de celkweek.
GO: MC-qPCR is positief op één of meerdere weefsels.
NO-GO: MC-qPCR is negatief op alle onderzochte weefsels.

Subdoel 3: Met het verkregen T. gondii weefsel nagaan welke concentraties van zout en andere additieven T. gondii inactiveren en daarmee de vleeswaren veiliger maken. Deze tests worden alleen uitgevoerd met behulp van de celkweek.

- In overleg met de producenten van vleeswaren zijn 16 procesmaatregelen opgesteld die getest zullen worden op afdoding van T. gondii in de celkweek. Deze bevatten een reeks aan NaCl concentraties, en toevoeging van natriumlactaat en natriumacetaat bij een vaste concentratie NaCl (zie voor details 3.4.2). De gekozen combinaties komen overeen met de recepturen van de producenten van vleeswaren. De resultaten van het onderzoek zijn dus in de praktijk toepasbaar.
- Deze experimenten vinden dus alleen plaats met de celkweek en nog niet in de muisbioassay.
- De resultaten van de celkweek geëvalueerd worden en er zal besloten worden welke procesmaatregelen voldoende aanknopingspunten bieden om de verkregen resultaten te confirmeren in de muisbioassay. Maatregelen die met behulp van de celkweek niet effectief blijken hoeven niet in de muisbioassay bevestigd te worden, hiermee worden worden muizen bespaard. Milestones:
 - Effect procesmaatregelen op de afdoding van bradyzoieten met behulp van celkweek.
 - Lijst met procesmaatregelen die geconfirmeerd zullen worden in de muisbioassay.

Subdoel 4: Confirmatie van de resultaten verkregen met de celkweek (subdoel 3) met de muisbioassay. De muisbioassay is de 'gouden standaard'. De resultaten van afdoding van T. gondii door procesmaatregelen zal getest worden in de celkweek en vergeleken worden met de muisbioassay.

- In dit onderdeel wordt de bepaling van de detectielimiet van de celkweek herhaald (zie subdoel 3) en vergeleken met de detectielimiet in de muisbioassay.
- Ook zal er een confirmatie plaatsvinden van de bevindingen van subdoel 3, als validatie van de resultaten van de celkweek. De resultaten van afdoding van T. gondii door procesmaatregelen zal getest worden in de celkweek en vergeleken worden met de muisbioassay. Milestones:
 - Op basis van de vergelijking van de detectielimiet zullen conclusies getrokken worden over de mogelijkheden om de muisbioassay te vervangen door de celkweek.
 - Voor de verschillende procesmaatregelen worden de resultaten uit celkweek en muisbioassay gebruikt om een conclusie te trekken wat betreft effectiviteit van afdoding.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

Natuurlijk geïnfecteerd T. gondii positief schapenvlees

- In paragraaf 3.1 wordt beschreven hoe in het voorgaande project AVD5.1 lid2h geïnfecteerd weefsel is verkregen, namelijk door middel van slachthuis materiaal (schapen harten).

- Het doel in het voorgaande project was om vlees van natuurlijk T. gondii geïnfecteerde dieren te gebruiken. De voorkeur ging daarbij uit naar rundvlees (omdat filet americain hiervan gemaakt wordt), echter het aantal levende T. gondii infecties in rund is erg laag en daarom is het niet mogelijk om T. gondii geïnfecteerd rundvlees te verkrijgen.
- Schapen werden geselecteerd omdat bekend is dat de seroprevalentie bij schapen hoog is (Opsteegh et al., 2010) en dat er een goede overeenstemming is tussen de detectie van antilichamen en de aanwezigheid van T. gondii. Bovendien is het hart geïdentificeerd als voorkeursplaats (Opsteegh et al., 2016).
- Helaas bleek tijdens de uitvoering van de experimenten de hoeveelheid geïnfecteerd vlees laag en er was extra spiking (toevoeging) met weefselcysten nodig.
- Redenen voor het beperkte aantal positieve schapen zijn dat de concentratie van weefselcysten bij positieve dieren te laag was en dat de verdeling van weefselcysten over het vlees niet homogeen was.

Experimenteel geïnfecteerd T. gondii positief schapenvlees

- Voor dit vervolgproject is de vervangende strategie om schapen experimenteel te infecteren met T. gondii.
- Door dit te doen is de verwachting dat deze dieren een meer betrouwbare bron van T. gondii positief vlees zijn dan harten van schapen uit het slachthuis.
- Dit omdat van schapen die experimenteel geïnfecteerd zijn met T. gondii het zeker is dat er een infectie heeft plaatsgevonden en er van de positieve dieren naast het hart veel spiermateriaal beschikbaar is.
- Van harten uit het slachthuis is niet bekend of het schaap geïnfecteerd was met T. gondii en hoe hoog de concentratie van bradyzoieten was. Deze concentratie kan variëren van laag naar hoog.
- Met een experimentele infectie daarentegen kan gemikt worden op een hoge concentratie weefselcysten in het vlees van het schaap. Dit kan door een relatief hoge infectiedosis te gebruiken. In Opsteegh et al., 2016 worden challenge experimenten beschreven in schapen met 5×10^5 oöcysten. Deze relatief hoge challenge dosis werd succesvol gebruikt om de verspreiding van T. gondii naar zoveel mogelijk weefsels te realiseren. Esteban-Redondo et al., (1999) vond vaker T. gondii in schapen geïnfecteerd met een dosis van 5×10^5 dan in schapen geïnfecteerd met 5×10^3 oöcysten.
- Een hogere dosis leidt niet tot meer klinische symptomen na infectie. Benavides et al., 2011 gebruikte 5×10^3 en 5×10^5 oöcysten om schapen te infecteren en had de ervaring dat bij beide challenge doses er alleen een temperatuurverhoging werd gemeten gedurende enkele dagen.
- Er worden dus meer weefselcysten gevonden bij een hogere dosis en een hogere dosis geeft geen aanleiding tot een hogere ziektelast voor het schaap.

Challenge periode

Uit gegevens in de literatuur blijkt dat na infectie met T. gondii schapen 6 weken of langer (12 weken, 6 maanden) aangehouden voordat euthanasie plaatsvindt (Dubey et al., 2009; Esteban-Redondo 1999). Uit onderzoek van weefsels van de schapen op 6 weken of 6 maanden na infectie bleek geen verschil in de verspreiding van T. gondii (Esteban-Redondo et al., 1999).

Schapen of varkens infecteren

Uit de literatuur blijkt dat ook varkens experimenteel geïnfecteerd kunnen worden om T. gondii positief vlees te verkrijgen. Net als schapen ontwikkelen varkens beperkte klinische symptomen en bij beide behoort een orale infectie met oöcysten tot de natuurlijke mogelijkheden voor een T. gondii infectie (Dubey, 2010). De voorkeur gaat echter uit naar schapen vanwege de opgedane ervaringen in het eerste project.

De celkweekmethode uitgelegd

T. gondii is een intracellulaire parasiet en voor de kweek in het laboratorium zijn cellen nodig voor de groei van T. gondii. Voor dit project worden RK13 en Vero cellen gebruikt. Beide cellijnen komen oorspronkelijk uit dieren, maar worden proefdiervrij uit de stikstofcollectie opgekweekt en vermeerderd.

In een celkweek worden cellen in het laboratorium opgekweekt: deze cellen worden in een kweekschaal gebracht in een vloeibaar groeimedium. De cellen gaan zich vermenigvuldigen en vormen een monolayer (een laag) van cellen op de bodem van de kweekschaal. De beoordeling van

de groei van de cellen in de celkweek gebeurt met de microscoop. Wanneer de monolayer ongeveer de hele fles bedekt worden tachyzoiten, bradyzoiten of het digest van geïnfecteerd vlees opgebracht. De tachyzoiten of bradyzoiten dringen de cellen binnen en vermenigvuldigen zich intracellulair tot zij de cel verlaten en volgende cellen infecteren. Groei van *T. gondii* kan waargenomen worden doordat de cellen doodgaan. Het doodgaan van de cellen duidt er op dat er beschadigingen zijn, dat heeft dus een soort signaalfunctie dat er iets met de cellen aan de hand is. Uitleesparameter voor de groei is een qPCR (quantitative PCR). Hiermee kan kwantitatief de hoeveelheid *T. gondii* DNA bepaald worden in een monster. Gedurende drie weken, wordt iedere week een deel van het kweekmedium weggenomen en wordt bepaald hoeveel *T. gondii* DNA aanwezig is. Groei van tachyzoieten of bradyzoieten in een weefselkweek wordt gekenmerkt door een toename van *T. gondii* DNA in het kweekmedium in de loop van de tijd. Dat kan dus worden afgelezen uit de resultaten van de qPCR.

Perspectief van de celkweekmethode

De celkweek kan de muisbioassay vervangen. In het kader van de *T. gondii* voedselveiligheid van vlees wordt de muisbioassay gebruikt voor:

- Referentietest voor de validatie van diagnostische testen (PCR, ELISA).
- Pathogenese en prevalentie studies om na te gaan welke dieren en welke organen van dieren geïnfecteerd zijn met *T. gondii*. Hierbij wordt soms eerst gebruik gemaakt van serologie of PCR, maar wordt muisbioassay gebruikt om te bepalen of de aanwezigheid van antilichamen of parasitair DNA ook betekent dat er infectieuze *T. gondii* aanwezig is.
- Inactivatiestudies van *T. gondii* in vlees, zoals de studie die wij willen uitvoeren. In deze studie onderzoeken we het effect van zout, lactaat en acetaat. Echter, hier houdt het onderzoek niet mee op. Er kunnen ook andere toevoegingen (andere conserveringszouten of bijvoorbeeld specerijen en saus) en bewerkingen (drogen, roken, vriezen, verhitten, fermenteren) onderzocht worden met de muis bioassay.

Bij al deze toepassingen kan een celkweek de muisbioassay vervangen. Daarnaast is het mogelijk dat de muisbioassay op kleinere schaal wordt gebruikt omdat de celkweek al een heel aantal antwoorden geeft. In dat geval is er dus een vermindering in plaats van een complete vervanging. Bovendien is het mogelijk om met een celkweek meer variaties te onderzoeken dan met een muisbioassay kan gebeuren. Een muisbioassay is altijd beperkend in het aantal monsters. Afrondend kan gezegd worden dat er veel perspectief is voor de celkweekmethode.

Detectielimiet van de muisbioassay

Inderdaad is er kennis over de detectielimiet van de muisbioassay. Een voorbeeld daarvan is een publicatie van Guo et al., 2016, waarnaar verwezen wordt in bijlage 2 (DAP muisbioassay onder A). Echter, uit de literatuur is ook duidelijk dat de detectielimiet kan verschillen, onder andere door verschillen in virulentie van de gebruikte *T. gondii* stammen en de gevoeligheid van de gebruikte muizen voor een *T. gondii* infectie. Er is geen vaste waarde die onder alle omstandigheden geldig is. Ons hoofddoel is niet het bepalen van de detectielimiet van de muisbioassay, maar de vergelijking tussen de detectielimiet van muisbioassay en celkweek. Voor een dergelijke test dienen zowel de celkweek als de muisbioassay parallel aan elkaar uitgevoerd te worden met hetzelfde uitgangsmateriaal. Pas dan kan op een verantwoorde wijze een conclusie getrokken worden over de detectielimiet in de muisbioassay en in de celkweek.

De informatie uit Guo et al., 2016 heeft ons geholpen om de reeks te bepalen die we willen testen. Het gaat hier om een range van 10 tot 10.000 bradyzoieten. Daarnaast is het voornemen om ook de invloed van vleesdigest op de detectielimiet te bepalen.

Lijst met procesmaatregelen

In overleg met de producenten van vleeswaren zijn 16 procesmaatregelen opgesteld die getest zullen worden op afdoding van *T. gondii* in de celkweek. Deze bevatten een reeks aan NaCl concentraties, en toevoeging van natriumlactaat en natriumacetaat bij een vaste concentratie NaCl (zie figuur hieronder). De zoutconcentraties zijn zodanig gekozen dat ze de belangrijkste recepturen van de vier bij dit project betrokken producenten van vleeswaren omvatten. Tijdsstechnisch gezien kan er één serie gebeuren op een dag. Voor het uitvoeren van de testen zijn er per serie 4 controles nodig, totaal 8.

Zoals uit het schema valt af te lezen zijn er drie groepen met 1.2% NaCl, verdeeld over twee series. De reden om deze concentratie drie keer te testen is als volgt:

- * Serie 1 gebeurt op de ene dag en serie 2 op de volgende dag. Praktisch gezien is het onhaalbaar om beide series op één dag te doen, daarom is het verdeeld.
- * Verder dient er rekening gehouden te worden met variaties per dag omdat het startmateriaal kan verschillen. Om die reden willen we graag de complete serie van zoutconcentraties testen op dag 1 en er niet één tussen uit halen om daar de resultaten van een andere dag bij in te voegen, zoals u voorstelt.
- * Tot slot willen we opmerken dat in serie 2 wordt nagegaan wat het additionele effect is van lactaat en acetaat aan de inactivatie met zout op T. gondii. Zout is waarschijnlijk het meest belangrijk voor inactivatie maar van lactaat en acetaat wordt verwacht dat deze ook een effect hebben. Om dit goed te testen voeren we die bepalingen in duplo uit. En daarbij is dus ook 1.2% zout nodig, anders is het niet mogelijk om het additionele effect van lactaat en acetaat te bepalen.

Het klopt dat de levensmiddelenindustrie werkt aan verlaging van zout in voeding, ook in vleeswaren.

Bij het opstellen van de 16 procesmaatregelen is gebruik gemaakt van de huidige recepturen van vier bij dit project betrokken vleeswarenfabrikanten. De zoutreeks is in overleg met hen vastgesteld.

In filet americain is de zoutconcentratie meestal tussen 1,2 en 1,8%, maar kan ook 2.5% zijn.

Vanuit literatuur is bekend dat 2 % zout T. gondii afdood. Dus een zoutconcentratie van 3% zou zeker effectief moeten zijn. Een volledig effectieve zoutconcentratie is een belangrijke controle in de experimenten en nodig voor de modellering van het effect van zout.

We wijzen er op dat dit project van waarde is voor de vleeswarenindustrie omdat duidelijk wordt hoeveel zout er nodig is om T. gondii in rauwe vleeswaren af te doden. Juist in het licht van de trend naar vermindering van zout is onderdosering een risico en moet overdosering worden voorkomen.

Zout in vleeswaren

Wat betreft de zoutconcentraties in de praktijk is er een convenant productverbetering afgesloten tussen de overheid (VWS) en de levensmiddelenindustrie (FNLI). Hierin zijn inspanningen afgesproken om het zoutgehalte en het verzadigd vetgehalte van een groot aantal producten stapsgewijs te verlagen. Er is een wetenschappelijke adviescommissie samengesteld die het akkoord verbetering productsamenstelling begeleidt.

<https://www.akkoordverbeteringproductsamenstelling.nl/organisatie/wetenschappelijke-adviescommissie>. Jaarlijks heeft de NVWA en het RIVM onderzoek uitgevoerd naar de voortgang.

In een NVWA rapport uit 2016 (Monitoring van het gehalte aan keukenzout in diverse levensmiddelen) staat beschreven wat het gemiddelde zoutgehalte (bepaling van gehalte natrium * 2,5) is in 960 bemonsterde en gemeten vleeswaren, nl 1,28 gram zout per 100 gram. De laagst gemeten waarde was 0,03 gram zout per 100 gram, de hoogst gemeten waarde 7,93 gram zout per 100 gram product. Deze gemeten waarden van 2016 zijn 10 % lager dan gemeten in 2011, de trend gaat de goede kant op.

In het met de overheid afgesloten convenant zijn de "rauwe" gezouten vleeswaren in verband met voedselveiligheid uitgesloten van het programma om het zoutgehalte te verlagen. Producten zoals runderrookvlees, paardenrookvlees, bressoala, rauwe ham, ontbijtspek zijn niet veilig te produceren en te bewaren met een zoutgehalte onder de 3%. Deze producten hebben een zoutgehalte uiteenlopend van 3,5% tot 5%.

	Serie 1		Serie 2
D1	Negatief	D13	Negatief
D2	Negatief + weefselcysten	D14	Negatief + weefselcysten
D3	Positief onbehandeld	D15	Positief onbehandeld
D4	Positief onbehandeld	D16	Positief onbehandeld
D5	0.9% NaCl	D17	1.2% NaCl + 1.2% lac
D6	1.2% NaCl	D18	1.2% NaCl + 1.2% lac
D7	1.5% NaCl	D19	1.2% NaCl + 2% lac
D8	1.8% NaCl	D20	1.2% NaCl + 2% lac
D9	2.1% NaCl	D21	1.2% NaCl + 1.2% lac + 0.4% ac
D10	2.4% NaCl	D22	1.2% NaCl + 1.2% lac + 0.4% ac
D11	2.7% NaCl	D23	1.2% NaCl
D12	3.0% NaCl	D24	1.2% NaCl

3.4.3 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	Toxoplasma gondii infectie van schapen
2	Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay



Centrale Commissie Dierproeven

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028)

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	5.1 lid2h	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	5.1 lid2h	
1.3	List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Toxoplasma gondii infectie van schapen

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Doel en algemene opzet van deze dierproef

Doel van deze dierproef is om *Toxoplasma gondii* positief schapenvlees te verkrijgen. De eerste stap is om vast te stellen of dit model voldoende *T. gondii* positief vlees oplevert. Als dit vastgesteld is dan zal dit positieve vlees gebruikt worden om de celweek te valideren. Verder ook om de huidige procesmaatregelen voor de bereiding van rauwe vleeswaren te evalueren en indien nodig aan te passen.

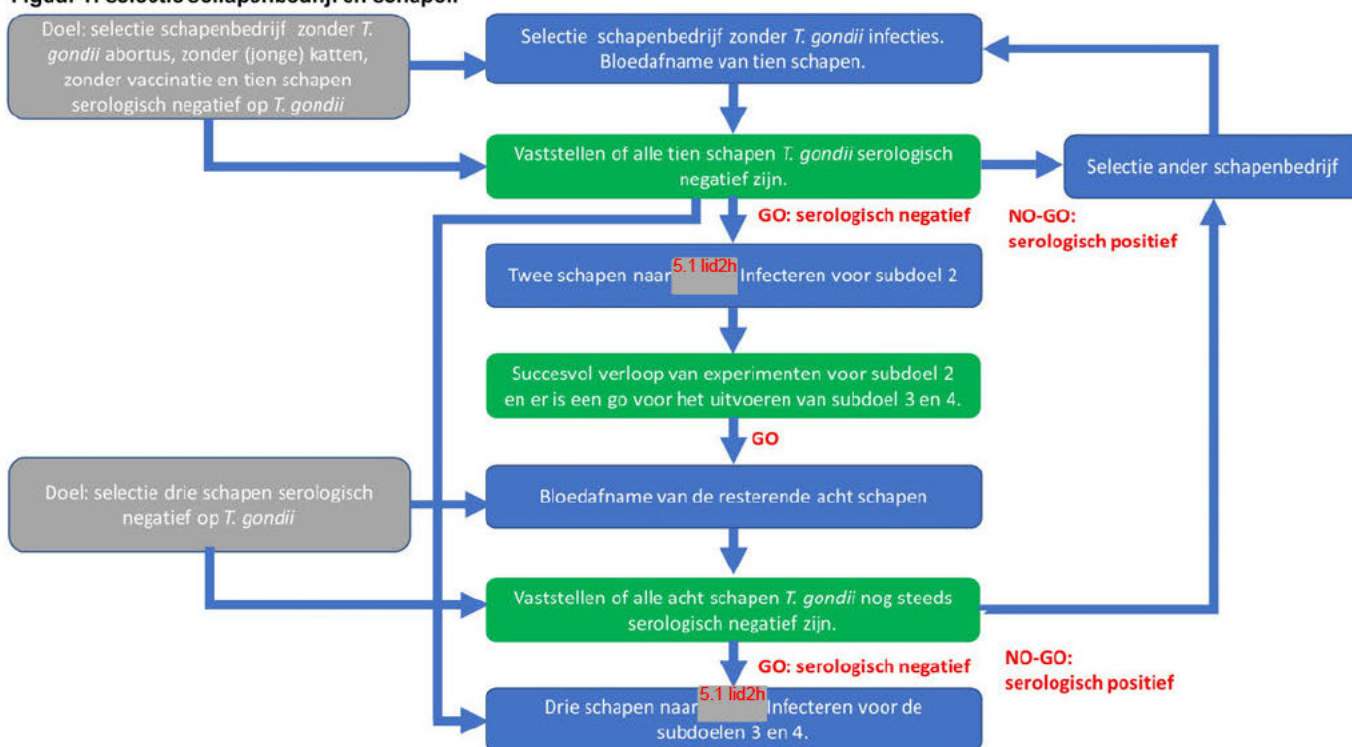
Samengevat wordt positief besmet vlees verkregen voor de volgende 3 subdoelstellingen (zie project proposal paragraaf 3.2.1):

- Subdoel 2: Gebruik van een diermodel (uit de literatuur) om onder experimentele omstandigheden voldoende *T. gondii* besmet weefsel te verkrijgen.
- Subdoel 3: Bewerkt weefsel testen met de celweek om te bepalen of *T. gondii* is geïnactiveerd.
- Subdoel 4: Vergelijking van muisbioassay en celweek voor validatie van celweek om de muisbioassay te vervangen.

Selectie schapenbedrijf en schapen

In figuur 1 staat hoe de werkwijze zal zijn om een schapenbedrijf met een laag *T. gondii* risico te selecteren en om *T. gondii* serologisch negatieve schapen te verkrijgen. Geschikte schapen zullen worden verkregen op twee verschillende momenten: 1) twee schapen voor subdoel 2 en 2) drie schapen voor de subdoelen 3 en 4.

Figuur 1: selectie schapenbedrijf en schapen



T. gondii positief schapenvlees

- Voor het verkrijgen van *T. gondii*-positief vlees zullen schapen experimenteel (oraal) worden geïnfecteerd met *T. gondii* oöcysten. Oöcysten zijn gekozen om mee te infecteren omdat natuurlijke infecties van schapen ook oraal plaatsvinden met oöcysten. Op deze wijze wordt een natuurlijke infectie dicht benaderd. 10 weken na infectie worden de dieren geëuthanaseerd om het geïnfecteerde weefsel te verkrijgen.
- In figuur 2 staat de algemene opzet van de experimentele infectie in subdoel 2.
- In figuur 3 staat de algemene opzet van de experimentele infectie in de subdoelen 3 en 4.

Selectie schapenbedrijf en schapen

- Selectie van een schapenbedrijf met een laag risico voor *T. gondii* infecties door uitvragen van de abortushistorie, vaststellen of er *T. gondii* vaccinatie wordt toegepast, afwezigheid van (jonge) katten op het bedrijf, gevolgd door serologisch onderzoek op *T. gondii* antilichamen bij 10 schapen (figuur 1).

Experimentele infectie 2 schapen (subdoel 2)

- Transport van twee *T. gondii* serologisch negatieve schapen naar 5.1 lid2h
- Oraal infecteren met *T. gondii* oöcysten
- Dagelijks temperaturen en beoordelen ademhalingsfrequentie gedurende de eerste twee weken.
- Wekelijks bloedafname voor bepaling antilichaamtiter tegen *T. gondii*.
- Tien weken na infectie: Transport van het dierverslijf naar de sectiezaal van 5.1 lid2h
- Anesthesie gevolgd door euthanasie van de schapen.
- Uitsnijden van hart, middenrif en spierdelen.

Experimentele infectie 3 schapen (subdoel 3 en 4)

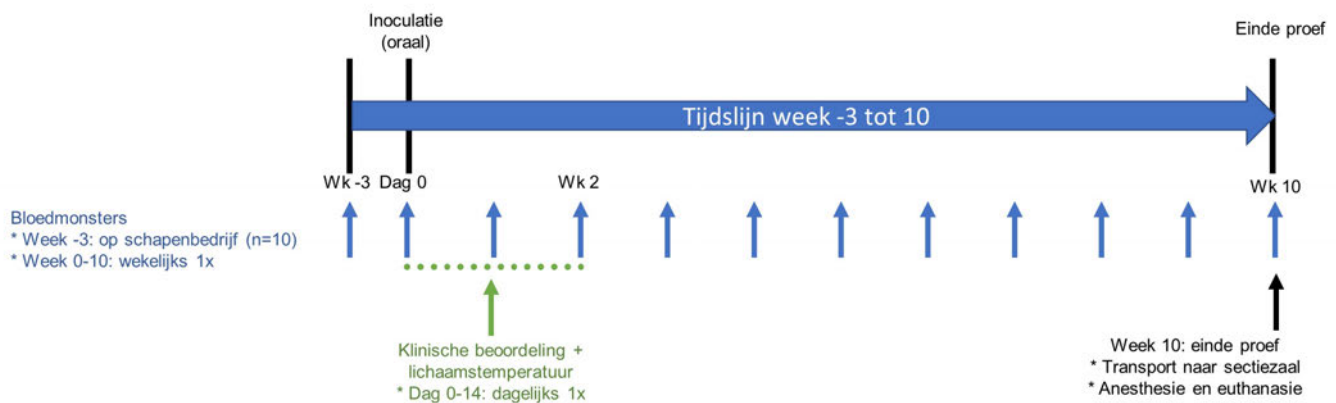
- Serologisch onderzoek resterende acht schapen
- Transport van drie serologisch negatieve schapen naar 5.1 lid2h
- Oraal infecteren met T. gondii oöcysten
- Dagelijks temperaturen en beoordelen ademhalingsfrequentie gedurende de eerste twee weken. Er zijn nauwelijks klinische symptomen te verwachten na een infectie. En als het gebeurt, dan alleen tijdens de eerste twee weken na infectie.
- Wekelijks bloedafname voor bepaling antilichaamtiter tegen T. gondii. Voor de schapen die langer dan 10 weken worden aangehouden is er een bloedafname eens in de drie weken. Dit is ter controle van de antilichaam titers.
- Tien weken en 20 weken na infectie: Transport van het dierverblijf naar de sectiezaal van 5.1 lid2h
- Anesthesie gevolgd door euthanasie van de schapen.
- Uitsnijden van hart, middenrif en spierdelen.

Primaire uitkomstparameters

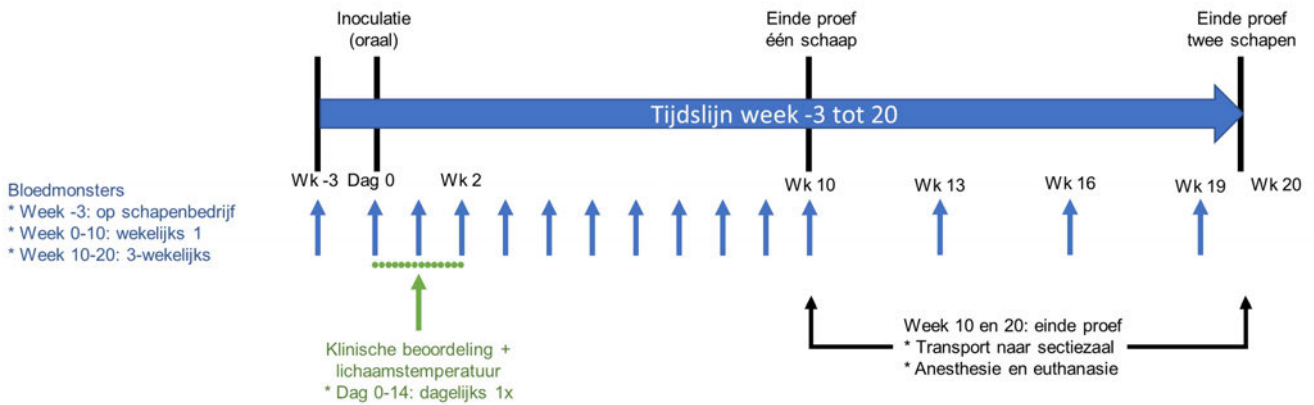
- Succesvolle selectie van een laag risico T. gondii schapenbedrijf en T. gondii serologisch negatieve schapen.
- Duidelijke immuunrespons na infectie meetbaar in besmette schapen.
- Succesvolle besmetting van schapen, zodat in hart, middenrif en spieren voldoende weefselcysten aanwezig zijn om op een valide manier de celkweek test uit te voeren.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Figuur 2: subdoel 2 – experimentele besmetting twee schapen



Figuur 3: subdoel 3 en 4 - experimentele besmetting drie schapen



Experimentele opzet

Kort overzicht van de handelingen aan de schapen (subdoel 2, figuur 2).

- maand -1: selectie T. gondii schapenbedrijf op basis van onderstaande criteria*. 5.1 lid2h betreft de schapen van vaste leverancier, dit schapenbedrijf zal ook nu benaderd worden.
- dag -21: bepaling T. gondii serologische status van het bedrijf. Daarvoor zullen 10 schapen geselecteerd worden en zal er bloed afgenomen worden van deze schapen via de vena jugularis, waarbij het schaap gefixeerd wordt en 5 ml bloed wordt afgenomen. □ 1 bloedafname – duur < 1 minuut.
- dag -7: selectie van twee schapen (van de 10 serologisch onderzochte) en transport van het schapenbedrijf naar de dierfaciliteiten van 5.1 lid2h. Het transport zal uitgevoerd worden met een vrachtauto, geschikt voor diertransport. □ Eenmalig transport – duur (maximaal 2 uur).
- dag 0: de twee schapen worden geïnfecteerd met 5×10^5 T. gondii oöcysten. De oöcysten zullen worden verkregen van een T. gondii onderzoeksgroep elders. De infectie met oöcysten zal middels orale toediening plaatsvinden. □ eenmalige orale toediening. Voor deze toediening worden de schapen kortdurend gefixeerd - duur < 1 minuut
- dag -7- week 10: ophokken van de schapen. Dit omdat kort na infectie er een darm passage kan plaatsvinden waardoor oöcysten in het milieu terecht kunnen komen. Verder ook om klinische monitoring en bloedafname gemakkelijker te maken.
- dag 0-14: dagelijks wordt de lichaamstemperatuur gemeten van de geïnfecteerde schapen en worden de schapen gemonitord op ademhalingsfrequentie. □ De schapen worden kortdurend gefixeerd om een rectale thermometer in te brengen die de lichaamstemperatuur meet. Observatie van het schaap vindt plaats op korte afstand – duur fixatie voor temperatuurmeting is enkele minuten.
- week 1-10: wekelijks bloedmonsters nemen tot het moment van euthanasie (week 10). □ bloedafname van deze schapen is via de vena jugularis, waarbij het schaap gefixeerd wordt en 5 ml bloed wordt afgenomen - duur < 1 minuut per afname - maximaal 10 bloedsamples per schaap.
- week 10: vervoer naar de sectiezaal van 5.1 lid2h voor euthanasie en sectie. □ Het vervoer is over een afstand van ± 10 km en zal uitgevoerd worden met een vrachtauto, geschikt voor diertransport. - duur transport < 30 minuten.
- week 10: Anesthesie gevolgd door euthanasie – de duur van het inleiden van de anesthesie is enkele seconden.

Kort overzicht van de handelingen aan de schapen (subdoel 3 en 4, figuur 3).

- dag -21: bevestiging van de (laag risico) T. gondii status van het bedrijf door bloedafname van

acht schapen voor bepaling T. gondii serologie. Dit betreft dezelfde schapen die in het kader van subdoel 2 al serologisch onderzocht waren op T. gondii.

- dag -7 selectie van drie schapen (van de acht serologisch onderzochte) en transport van het schapenbedrijf naar de dierfaciliteiten van 5.1 lid2h. Het transport zal uitgevoerd worden met een vrachtauto, geschikt voor diertransport. □ Eenmalig transport – duur (maximaal 2 uur).
- dag 0: de drie schapen worden geïnfecteerd zoals hierboven beschreven.
- dag -7 – week 20: ophokken van de schapen zoals hierboven omschreven voor dag -7 - week 10
- dag 0-14: zoals hierboven beschreven
- week 1-20: wekelijks bloedmonsters nemen van de drie schapen tot het moment van euthanasie voor het eerste schaap (van de drie en in week 10) en voor het tweede en derde schaap eens in de drie weken van week 10 tot week 20. □ bloedafname is via de vena jugularis, waarbij het schaap gefixeerd wordt en 5 ml bloed wordt afgenomen - duur < 1 minuut per afname - maximaal 10 bloedsamples voor het eerste schaap en maximaal 13 voor de overige twee schapen.
- week 10: vervoer naar de sectiezaal van 5.1 lid2h voor euthanasie en sectie. □ Het vervoer is over een afstand van ±10 km en zal uitgevoerd worden met een vrachtauto, geschikt voor diertransport. - duur transport < 30 minuten.
- week 10: Anesthesie gevolgd door euthanasie – de duur van het inleiden van de anesthesie is enkele seconden.

*Selectiecriteria voor het schapenbedrijf waar de schapen van betrokken worden:

Doel is om een schapenbedrijf te selecteren met een laag risico op T. gondii infecties. Criteria hiervoor zijn:

- Er komen geen abortussen voor als gevolg van een T. gondii infectie.
- Er wordt niet gevaccineerd tegen T. gondii. Gevaccineerde schapen hebben antilichamen tegen T. gondii en een experimentele infectie zal vanwege die reden niet aanslaan in deze schapen.
- Er zijn geen (jonge) katten op het schapenbedrijf.
- Serologisch onderzoek van 10 schapen (van de gewenste leeftijd) om te bevestigen dat het bedrijf een laag-risico T. gondii bedrijf is. Bloedafname zal plaatsvinden nog op het schapenbedrijf en wanneer deze schapen negatief testen is de kans dat T. gondii op het bedrijf voorkomt met een prevalentie van 26% of hoger kleiner dan 5% (<https://epitools.ausvet.com.au/herdsensfive>).
- Schapen zijn minimaal 10 weken oud. Op het tijdstip van euthanasie zijn ze 20 weken oud. Dan zijn ze groot genoeg om te zorgen voor voldoende vlees voor het beoogde onderzoek.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

Selectie schapen

- Twee schapen voor de experimenten voor subdoel 2 en vervolgens drie voor de subdoelen 3 en 4.

Benodigde aantal schapen voor het verkrijgen van voldoende T. gondii geïnfecteerd vlees

- Voor het uitvoeren van de procesmaatregelen zijn porties vlees nodig van 50 gram. Er zijn 16 verschillende procesmaatregelen gedefinieerd in overleg met de vleeswarenindustrie om die te testen (zie paragraaf 3.4.2 van het project proposal). Deze 16 procesmaatregelen (plus 8 controles) zullen twee keer uitgevoerd worden in subdoel 3. Totaal: 48 monsters a 50 gram = 2.4 kg vlees nodig. Weidelammeren van 20 weken oud wegen 31 - 33 kg. Ongeveer de helft hiervan is spierweefsel wat gebruikt kan worden voor de procesmaatregelen. Eén schaap is dus voldoende voor het uitvoeren van procesmaatregelen per subdoel.
- Vlees van geïnfecteerde schapen kan maximaal twee weken bij 4°C bewaard worden. Weefselcysten zijn levensvatbaar tijdens die periode. Dat betekent dat in die periode het vlees geschikt is voor onze analyses/ laboratoriumexperimenten. De laboratoriumexperimenten duren minimaal 6 weken voor ieder subdoel. Voor de uitvoering van de laboratoriumexperimenten voor een volgend subdoel is dus weer een 'nieuw' schaap nodig.

Aantal schapen benodigd voor subdoelstelling 2, 3 en 4

- In de literatuur (Dubey, 2009) wordt vermeld dat de kans erg groot is dat een infectie aanslaat maar dat er wel verschil is in weefsels die T. gondii positief worden. Om beter zicht te krijgen op verspreiding van T. gondii over de weefsels en over de hoogte van de T. gondii in de weefsels zullen experimenten met twee schapen worden uitgevoerd. Verder is het huisvesten van twee dieren in het kader van dierwelzijn beter dan het huisvesten van één solitair schaap.

- Nadat de experimenten op de eerste twee schapen gedaan zijn kunnen we vaststellen op basis van onze go-no go criteria of de aanpak voldoende geschikt is voor het beantwoorden van subdoelen 3 en 4.
- Voor subdoel 3 en 4 zullen drie schapen tegelijk worden geïnfecteerd. Voor de experimenten voor elk subdoel is één schaap nodig. Er zijn dus minimaal twee schapen nodig.
- De keuze om drie schapen te infecteren is omdat er altijd onvoorziene situaties kunnen optreden waardoor één van de schapen niet meer gebruikt kan worden. Bijvoorbeeld één van de dieren wordt ziek en moet voortijdig uit de proef gehaald worden. Of er ontstaat een onvoorziene situatie in het laboratorium waardoor herhaling van een experiment noodzakelijk is.
- Voor subdoel 3 zal één schaap worden gebruikt. Voor subdoel 4 blijven dan twee schapen over. Het huisvesten van twee dieren in het kader van dierwelzijn beter dan het huisvesten van één solitair schaap.

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	44 - Sheep	Afkomstig van reguliere leveranciers. 5.1 lid2h	>10 weken	10	Geen voorkeur. Afhankelijk van beschikbaarheid.	n.v.t.	Geen voorkeur. Afhankelijk van beschikbaarheid.

Provide justifications for these choices

Species

Schapen zullen experimenteel geïnfecteerd worden met T. gondii. In het project proposal in paragraaf 3.4.2 staat een verantwoording van de keuze hiervoor. Hieronder volgt een korte samenvatting.

- Schapen worden gemakkelijk geïnfecteerd met T. gondii en T. gondii is een belangrijk oorzaak van abortus bij schapen.
- Experimentele infecties van schapen gaan gepaard met weinig tot geen klinische symptomen.
- In het voorgaande project AVD5.1 lid2h is slachthuis materiaal (schapen harten) verkregen met als doel om T. gondii positieve harten te gebruiken in de experimenten. Helaas bleek tijdens de uitvoering van de experimenten dat de hoeveelheid geïnfecteerd vlees te laag was.
- De verwachting is dat geïnfecteerde schapen een meer betrouwbare bron van T. gondii positief vlees zijn dan harten van schapen uit het slachthuis, ook kan er gemikt worden op een hoge concentratie weefselcysten in het vlees van het schaap.
- Uit de literatuur blijkt dat ook varkens experimenteel geïnfecteerd kunnen worden om T. gondii positief vlees te verkrijgen. Net als schapen ontwikkelen varkens beperkte klinische symptomen en bij beide behoort een orale infectie met oöcysten tot de natuurlijke mogelijkheden voor een T. gondii infectie (Dubey, 2010). De voorkeur gaat echter uit naar schapen vanwege de opgedane ervaringen in het eerste project.
- Uit gegevens in de literatuur blijkt dat na infectie met T. gondii schapen 6 weken of langer (12 weken, 6 maanden) aangehouden voordat euthanasie plaatsvindt (Dubey et al., 2009; Esteban-Redondo 1999). Uit onderzoek van weefsels van de schapen op 6 weken of 6 maanden na infectie bleek geen verschil in de verspreiding van T. gondii (Esteban-Redondo et al., 1999).
- Uit de literatuur blijkt dat ook varkens experimenteel geïnfecteerd kunnen worden om T. gondii positief vlees te verkrijgen. Net als schapen ontwikkelen varkens beperkte klinische symptomen en bij beide behoort een orale infectie met oöcysten tot de natuurlijke mogelijkheden voor een T. gondii infectie (Dubey, 2010). De voorkeur gaat echter uit naar schapen vanwege de opgedane ervaringen in het eerste project.

Origin

Reguliere leveranciers van schapen aan 5.1 lid2h selectie op criteria benoemd onder Sectie A

Life stages

Ouder dan 10 weken.

Number

Zoals hierboven beschreven zal:

- serologisch onderzoek van 10 schapen (van de gewenste leeftijd) plaatsvinden om te bevestigen dat het bedrijf een laag-risico T. gondii bedrijf is.
- voor doel 2 twee schapen gebruikt worden en voor doel 3 en 4 drie schapen.

Gender

Er is geen voorkeur voor een geslacht. Het voornemen is om beide geslachten te gebruiken, afhankelijk van de beschikbaarheid bij de leverancier.

Genetic alterations

Geen

Strain

Geen voorkeur; afhankelijk van de beschikbaarheid bij de leveranciers

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Koorts: De normale lichaamstemperatuur van een schaap is tussen 38,5 en 40°C. In geval dat koorts ontstaat als gevolg van de infectie (mogelijk tijdens de eerste twee weken na infectie) die langer dan een dag aanhoudt (24 uur > 41°C) zal het schaap behandeld worden met een koortswerend middel. Hiervoor zal een niet-steroïdale anti-inflammatoire middel gebruikt worden (NSAID). Dit middel remt de ontstekingsreactie van het lichaam maar beïnvloedt de T. gondii parasiet niet.

Handelingen: Er zal mogelijk ongerief kunnen ontstaan door de orale toediening en bloedafnames, maar de verwachting is dat dit beperkt is. Vanwege dit beperkte en kortdurende ongerief is pijnverlichting onzes inziens niet opportuun omdat pijnverlichting ook pijn zal veroorzaken.

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

1. Subklinisch verloop na infectie: We verwachten nauwelijks tot geen klinische symptomen na een experimentele infectie van schapen met T. gondii. Dubey heeft in een review in 2009 een overzicht gemaakt van experimentele infecties in schapen die beschreven zijn in de literatuur. Uit dit review (van 16 studies) blijkt dat er niet tot amper klinische symptomen zijn na een T. gondii infectie. Schapen kunnen gedurende de eerste twee weken koorts krijgen en zo af en toe kan tijdens de koortperiode benauwdheid optreden. Dit uit zich in een verhoogde ademhalingsfrequentie. Deze bevindingen worden bevestigd door collega Toxoplasma -onderzoeker Frank Katzer (Moredun, Schotland) met ervaring in experimentele infecties in schapen.

Andere ongeriefgevendende factoren kunnen zijn:

2. Transport: het eerste transport is van de leverancier naar de proefdierlocatie van 5.1 lid2h en het tweede transport is van de proefdierlocatie van 5.1 lid2h naar de sectiezaal van 5.1 lid2h

3. Ophokken van de schapen bij 5.1 lid2h De schapen zijn bij de leverancier buiten, op de proefdierlocatie van 5.1 lid2h zullen ze binnen gehouden worden.

Explain why these effects may emerge.

1. Voor enkele dieren mogelijk kortdurende milde klinische verschijnselen (dit wordt niet verwacht) als gevolg van de blootstelling aan T. gondii oöcysten.
2. Transport naar de sectiezaal van 5.1 lid2h omdat daar onder de juiste condities de anesthesie, euthanasie en sectie uitgevoerd kunnen worden. De sectiezaal is hiervoor ingericht en de medewerkers die er werken zijn er voor opgeleid.
3. Verandering van huisvesting ontstaat doordat de dieren bij de leverancier buiten werden gehouden en bij 5.1 lid2h binnen.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

1. Handelingen aan de schapen worden uitgevoerd door bekwame biotechnici die in dagelijks contact zijn met de schapen zodat de dieren reeds gewend zijn aan contact met hen.
2. Een enkel schaap kan lichte klinische verschijnselen vertonen als gevolg van de T. gondii infectie. Dit is alleen voorzien tijdens de eerste twee weken na infectie. Door in die weken dagelijks de lichte temperatuur te meten en dagelijks het gedrag te observeren wordt dit gemonitord. Als één van de parameters een humaan eindpunt impliceert dan wordt het schaap vroegtijdig gedood en het benodigde weefsel van het schaap verzameld. De klinische beoordeling wordt uitgevoerd door biotechnici die ook de verzorging en handelingen aan de dieren doen. Doordat de biotechnici intensief interactie hebben met de schapen zullen ze afwijkend gedrag eerder waarnemen.
3. Het transport van de leverancier naar 5.1 lid2h duurt maximaal 2 uur. Transport van het diervverblijf naar de sectiezaal duurt maximaal 30 minuten. De schapen zullen in vrachtauto vervoerd worden die geschikt is voor dierttransport.
4. Verandering van huisvesting (buiten naar binnen) geeft stress, maar een acclimatisatieperiode (van één week) helpt de schapen om te dealen met die stress.

E. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question F.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

HEPs

- Twee dagen 41°C en reageert niet op een koortsremmend middel.
- Eet en drinkt niet en is sloom. Is, ondanks eventuele toediening van medicatie, gedurende 24 uur niet in staat om zelfstandig naar de eet- of drinkbak te gaan.
- Normale ademhalingsfrequentie voor schapen is 20 à 30 per minuut. Het HEP wordt bereikt als de ademhalingsfrequentie is drie keer zo hoog (80 à 90 per minuut) gedurende 24 uur.

Als het schaap aan één van deze drie HEPs voldoet, dan zal het schaap geëuthanaseerd worden om verder lijden van het schaap te voorkomen.

Indicate the likely incidence.

Het wordt niet verwacht dat schapen het humane eindpunt zullen bereiken, dus dit zal een uitzonderlijke situatie betreffen. De kans wordt ingeschat op < 1 %.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

No.	Procedure	Mate van ongerief	Duur van ongerief/max frequentie	Hoeveel schapen
1	Bloedafnames op schapenbedrijf voor selectie 2 schapen	Licht	1 minuut / éénmalig	10
2	Bloedafnames op schapenbedrijf voor selectie 3 schapen	Licht	1 minuut / éénmalig	8
3	Bloedafnames	Licht	1 minuut / 10 keer	1
4	Bloedafnames	Licht	1 minuut / 13 keer	2
5	Orale toediening van oöcysten	Licht	1 minuut / éénmalig	5
6	Lichaamstemperatuur metingen	Licht	1 minuut / 7 keer	5
7	Transport naar dierfaciliteit <small>5.1 lid2h</small> sectiezaal	Licht	2 uur / éénmalig	5
8	Transport naar sectiezaal <small>5.1 lid2h</small>	Licht	30 minuten / éénmalig	5
9	Anesthesie	Licht	1 minuut / éénmalig	5

Voor de negen procedures samen is de cumulatieve mate van het ongerief voor de schapen: orale toediening, frequente bloedafname gedurende lange tijd 100% matig.

G. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement

Zonder infectie van deze schapen kan het doel van het onderzoek (beheersen T. gondii voedselveiligheidsrisico's) niet bereikt worden.

1. Er is T. gondii besmet vlees nodig voor het uittesten van de verschillende procesmaatregelen en valideren van de celkweek als alternatief voor de muisbioassay. In het eerste project is geprobeerd om de procesmaatregelen uit te voeren met harten van schapen, verkregen in het slachthuis. Dit bleek echter een niet begaanbare weg omdat er onvoldoende positief materiaal werd verkregen (zie paragraaf 3.1 van het project proposal). De verwachting is dat door een experimentele infectie wel voldoende positief materiaal verkregen wordt. In een experimentele studie is de infectiegraad beter te sturen en dat maakt de kans op succes groter.
2. Een mogelijkheid om T. gondii positief vlees te verkrijgen is door het toevoegen van weefselcysten aan gemalen vlees. Echter, dit is een artificiële situatie en om de effectiviteit van de procesmaatregelen te kunnen testen is het gewenst om uit te gaan van vlees van een dier dat met T. gondii geïnfecteerd is omdat dit de werkelijkheid het beste benadert. Verder kunnen weefselcysten die in vlees aanwezig zijn mogelijk anders op de additieven reageren dan vrije weefselcysten die aan gemalen vlees worden toegevoegd. Voor het verkrijgen van weefselcysten is bovendien een dierproef nodig omdat weefselcysten alleen uit levende dieren verkregen kunnen worden.
3. Preventie van T. gondii infecties in dieren door een andere manier van dierhouderij met meer buitenloop van dieren is geen optie, buitenloop heeft eerder een averechts effect op T. gondii infecties in dieren. Vanwege de verspreiding van T. gondii in het milieu is het bijkans onmogelijk dat dieren (waaronder vooral runderen en schapen) die buiten lopen geen infectie met T. gondii oplopen. Preventie van T. gondii infecties in dieren door een strikt hygiëne regime waarbij de dieren niet meer buiten kunnen komen zou de T. gondii risico's verminderen. In de varkenshouderij in Nederland worden de meeste varkens gehouden onder gecontroleerde huisvestingscondities zonder buitenloop. Daardoor zijn de T. gondii risico's op deze bedrijven gemakkelijker te beheersen dan op schapen- en runderbedrijven waar dieren veel buiten zijn en dus geïnfecteerd kunnen raken met T. gondii. Een striktere hygiëne betekent ook dat welzijn van dieren daardoor in gedrang komt.

Reduction

1. Het geïnfecteerde schapenvlees wordt gebruikt voor twee doelstellingen: 1) vervangen van de muisbioassay door een in vitro alternatief en 2) om de huidige procesmaatregelen voor de bereiding van rauwe vleeswaren te evalueren en indien nodig aan te passen. Op zich zouden beide doelstellingen in twee aparte projecten en los van elkaar uitgevoerd kunnen worden. In dit project opzet worden ze gecombineerd waardoor minder dieren nodig zijn.
2. De eerste vraag die beantwoord zal worden in dit project is of er met een experimentele infectie van schapen voldoende T. gondii positief vlees verkregen kan worden om de procesmaatregelen te testen. Bij het eerste project werden harten van schapen uit het slachthuis gebruikt. Het bleek dat de concentratie van T. gondii parasieten in deze harten te laag was om de procesmaatregelen te testen. Dit is dus een kritisch onderdeel van het project en daarom is als subdoel 2 opgenomen of er voldoende T. gondii parasieten in het vlees aanwezig zijn en of het challenge model leidt tot het verkrijgen van voldoende T. gondii geïnfecteerd vlees. Wanneer het antwoord op deze vragen 'ja' is dan worden pas de volgende schapen geïnfecteerd met T. gondii.

Refinement

1. Bij de keuze van het aantal schapen is er op gelet om te voorkomen dat de schapen solitair worden gehuisvest. Dus dat er minimaal twee dieren bij elkaar lopen.
2. Er zijn weinig klinische symptomen te verwachten en bij koorts worden NSAIDs gebruikt.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

I. Repetition Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.n.v.t.

J. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

Op een regulier commercieel schapenbedrijf wordt bloed van schapen afgenomen voor screening.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Alleen de eerste bloedafname wordt gedaan bij de leverancier van de schapen. Dat is geen geregisteerde proefdier faciliteit. De vergunninghouder stelt de NVWA hiervan op de hoogte.

Het overige deel wordt uitgevoerd bij **5.1 lid2h** een geregistreerde proefdierfaciliteit.

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Het besmette weefsel is nodig om de proef te vervolgen. Dit weefsel wordt na het doden verkregen uit het dier en het betreft het hart, middenrif en spierweefsel.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Dieren worden onder anesthesie gebracht en geëuthanaseerd.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

n.v.t.



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028)

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	5.1 lid2h	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	5.1 lid2h	
1.3 List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number 2	Type of animal procedure Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Doel en algemene opzet van deze dierproef

De muisbioassay zal uitgevoerd worden om de resultaten verkregen met de celkweek te confirmeren en op die manier de celkweek te valideren (zie project proposal subdoel 4). De muisbioassay is de 'gouden standaard' en de enigste beschikbare methode om levende *T. gondii* parasieten aan te tonen in rauwe vleeswaren. De muisbioassay is een dierproef, het is de bedoeling dat de celkweek de muisbioassay gaat vervangen. In subdoel 2 (zie project proposal) is al nagegaan met de celkweek welke concentraties van zout en andere additieven *T. gondii* in *T. gondii*-positief schapenvlees inactiveren en daarmee de vleeswaren veiliger maken. Nu worden de testen in de celkweek herhaald en vergeleken met de resultaten van de muisbioassay.

De opzet van de muisbioassay zoals in deze bijlage beschreven is hetzelfde als de opzet van de voorgaande vergunning waarbij deze assay ook gebruikt is, namelijk AVD5.1 lid2h (Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende *Toxoplasma* parasieten in vlees met de muis bioassay).

De algemene opzet van deze dierproef wordt weergegeven in figuur 1:

Muisbioassay

Dag 0: Nemen van bloedmonsters en intraperitoneale inoculatie

Klinische beoordeling
* Dag -7 - 0: 1 x per dag

Klinische beoordeling
* Dag 0 - 14: 3 x per dag
* Dag 15 - 42: 1 x per dag



Subdoel 4

- Transport naar proefdierfaciliteit van [5.1 lid2h](#)
- Baseline bloedafname
- Inoculatie van 1 ml weefseldigest
- Dagelijkse klinische beoordeling van de muizen
- Onder anesthesie wordt bloed en weefsel afgenomen en daarna vindt de euthanasie plaats.

Primaire uitkomstparameters

- Bloedmonsters worden genomen aan het begin (gecombineerd met inoculatie) en eind (tijdens de euthanasie) van de proef. Beide bloedmonsters worden gebruikt om te onderzoeken op T. gondii antilichamen. Het eerste bloedmonster is een nulbloedmonster ter controle op afwezigheid van T. gondii antilichamen, het bloedmonster tijdens de euthanasie is om een eventuele antilichaamrespons te meten. Het meten van T. gondii antilichamen is indicatief voor een T. gondii infectie. Meestal ontwikkelt een muis klinische symptomen als gevolg van de T. gondii infectie en wordt de muis geëuthanaseerd voordat de antilichaamrespons detecteerbaar is. Soms verloopt de infectie subklinisch en ontwikkelt de muis een antilichaamrespons. Dit duidt op een T. gondii infectie.
- Hersenen worden verzameld om te onderzoeken met de PCR op T. gondii. Ongeveer twee weken na infectie migreren de tachyzoieten uit de buikholte naar het weefsel en ook naar de hersenen. Het aantonen van T. gondii in de hersenen duidt op de aanwezigheid van levende en daarom infectieuze T. gondii.
- Buikvocht wordt bij muizen die in de periode 4 -14 dagen na infectie geëuthanaseerd ook nog verzameld. Twee weken is te kort om weefselcysten te vormen in de hersenen, in die periode worden er alleen nog tachyzoieten in de buikholte gevormd en daarom wordt er ook buikvocht verzameld.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Experimentele opzet

Kort overzicht van de handelingen aan de muizen

1. dag -7: transport van 5.1 lid2h naar de proefdierfaciliteiten van 5.1 lid2h De benodigde tijd hiervoor zal ongeveer 12 uur zijn. De muizen worden bij 5.1 lid2h gehouden onder hBSL-2 condities (humaan biosafety level 2). Het gaat om Gamma-interferon-knockout muizen (GKO muizen) (zie voor details onderdeel B). Deze muizen zijn beschikbaar bij het FLI en worden als een onderdeel van de bijdrage aan het project door het 5.1 lid2h (5.1 lid2e) ter beschikking gesteld.
2. dag -7-0: dagelijks één keer klinische beoordeling. Dit is een onderdeel van de dagelijkse verzorging van de muizen.
3. dag -1-14: continue toediening van buprenorphine hydrochloride door drinkwater. Dit wordt gedaan om pijn en ongerief te bestrijden. Er wordt gestart op dag -1, dit is om een spiegel op te bouwen. Toediening is tot dag 14, dit is gedurende de periode dat de muizen het meeste ongerief hebben.
4. dag 0: bloedafname van de muizen. Voor deze handeling worden de muizen gefixeerd. Bloed wordt verkregen via een wangprik (submandibulaire punctie). □ 1 bloedafname – duur < 1 minuut
5. dag 0: intraperitoneale inoculatie van 1 ml weefseldigest (verteerd weefsel afkomstig van vlees van de procesbehandeling). Voor deze toediening worden de muizen gefixeerd. □ 1 toediening – duur < 1 minuut. Bloedafname en inoculatie worden achter elkaar uitgevoerd zodat het dier slechts eenmaal gefixeerd hoeft te worden.
6. dag 1-3: dagelijks drie keer klinische beoordeling omdat enkele dieren snel klinische verschijnselen ontwikkelen. Wanneer zieke muizen voldoen aan de HEPs worden de muizen geëuthanaseerd. Voor euthanasie wordt de muis gefixeerd. De muis worden onder anesthesie gebracht en volgens wordt het dier gedood door nekstrekking. - □ duur < 1 minuut.
Ter vervanging van de muis die geëuthanaseerd is wordt één van de reservemuizen intra peritoneaal geïnoculeerd met 1 ml van het weefseldigest zoals hierboven omschreven. Het betreft dan hetzelfde weefseldigest waar de gedode muis mee geïnoculeerd was. Deze periode is tekort voor het zich manifesteren van een T. gondii infectie, meestal is er in dit geval sprake van een bacteriologische infectie van de muis als gevolg van het toedienen van het weefseldigest.
7. dag 4-14: dagelijks drie keer klinische beoordeling. Wanneer zieke muizen voldoen aan de HEPs wordt een bloedmonster genomen van de muis en wordt de muis geëuthanaseerd. Voor euthanasie wordt de muis gefixeerd, onder anesthesie gebracht, een bloedmonster (oogextractie) genomen en daarna gedood - □ duur enkele minuten. Ook wordt buikvocht wordt verzameld om getest te worden met de PCR op T. gondii.
8. dag 15-42: dagelijks één keer klinische beoordeling. De ervaring van het vorige experiment is dat in deze fase de muizen niet meer klinisch ziek worden, om die reden wordt de frequentie verminderd dan drie naar één keer per dag. Wanneer zieke muizen voldoen aan de HEPs wordt een bloedmonster genomen zoals hierboven beschreven onder punt 7. De hersenen van de muizen worden verzameld om getest te worden met de PCR op T. gondii.
9. dag 42: einde proef. Van de resterende muizen worden bloedmonsters genomen en de hersenen verzameld zoals beschreven onder punt 7 en 8.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

Er worden twee muizen gebruikt per monster. Het inoculum wordt verdeeld over beide muizen. Op basis van de voorafgaande studies is vastgesteld dat de bepalingen in duplo uitgevoerd dienen te worden om een goede betrouwbaarheid te verkrijgen. Om deze reden worden met één monster twee muizen geïnoculeerd.

Muisbioassay (eerste deel): dosis response bradyzoieten (tabel 1)

Om de detectielimiet te bepalen wordt een dosis response studie uitgevoerd. Daarvoor wordt een reeks bradyzoiten bereid van laag tot hoog. Er is gekozen voor een reeks van 10 tot 10.000 bradyzoiten. Uit literatuur blijkt dat de detectielimiet (voor stam ME-49) in Swiss Webster muizen ongeveer 400 bradyzoiten is (Guo et al. 2016). De detectielimiet wordt bepaald in kweekmedium. Ook wordt nagegaan wat het effect is van de matrix op de detectielimiet. Daarvoor worden bradyzoieten toegevoegd aan digest van T. gondii negatief schapenvlees. De detectielimiet zal bepaald worden in celkweek en in de muisbioassay (zie tabel1).

Tabel 1: Sensitiviteit en invloed matrix

Dosis / matrix	Aantal proefgroepen	Aantal muizen
Kweekmedium (in duplo) als negatieve controle	2	4
10, 100, 1000, 10.000 levende bradyzoiten in kweekmedium (in duplo)	8	16
Vleesdigest schaap zonder spike (in duplo) als negatieve controle	2	4
10, 100, 1000, 10.000 levende bradyzoiten in vleesdigest schaap (in duplo)	8	16
Totaal	20	40

Muisbioassay (tweede deel): bevestiging van effectiviteit procesmaatregelen

In overleg met de producenten van vleeswaren zijn 16 procesmaatregelen opgesteld (met de daarbij behorende controles) die getest zullen worden op afdoding van T. gondii in de celkweek. Deze bevatten een reeks aan NaCl concentraties, en toevoeging van natriumlactaat en natriumacetaat bij een vaste concentratie NaCl. De concentraties zijn zodanig gekozen dat ze alle recepturen van de vier bij dit project betrokken producenten van vleeswaren omvatten (zie voor details project proposal 3.4.2.)

De procesmaatregelen die getest zullen worden in de muisbioassay zal bepaald worden zoals beschreven in subdoel 3 in paragraaf 3.4.1 van het project proposal. In dit subdoel wordt een lijst met procesmaatregelen opgesteld die geconfirmeerd zullen worden in de muisbioassay. Maatregelen die met behulp van de celkweek niet effectief blijken hoeven niet in de muisbioassay bevestigd te worden, hiermee worden muizen bespaard.

Tabel 2: Procesmaatregelen

Groepen / matrix	Aantal proefgroepen	Aantal muizen
<u>Week 1</u>		
• Testdag 1: Serie 1 t/m 12		
o Geïnfecteerd vlees verdelen in 50g porties.	8	16
o Acht procesmaatregelen.	4	8
o Vier controles: 1 x vlees negatief onbehandeld, 1x vlees met weefselcysten, 2 x positief vlees onbehandeld		
• Testdag 2: serie 13 t/m 24		
o Geïnfecteerd vlees verdelen in 50g porties.	8	16
o Acht procesmaatregelen.	4	8
o Vier controles: 1 x vlees negatief onbehandeld, 1x vlees met weefselcysten, 2 x positief vlees onbehandeld		
<u>Week 2</u>		
• Herhaling testdag 1 en 2	24	48
Totaal muizen	48	96

Reservemuizen

• Uit de resultaten van het voorgaande project AVD .1 lid2h (Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassay) bleek dat in de eerste drie dagen na infectie er 5 muizen van de 102 (5%) doodgingen. Hierboven (onder experimentele opzet)

staat beschreven dat ziekte en sterfte binnen de eerste drie dagen na inoculatie een te korte periode is voor een *T. gondii* infectie om zich te manifesteren en dat om die reden deze muizen worden vervangen door andere muizen.

- Op basis van de ervaringen in het voorgaande project verwachten we dus dat we 5% van de muizen moeten vervangen.
- In dit project zijn 40 (Tabel 1) en 96 (Tabel 2) muizen nodig. Totaal 136. Het aantal reservemuizen is 5% van 136 is 7 muizen.

Totaal aantal muizen wordt $40+96+7= 143$

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	01 - Mice	Afkomstig van 5.1 lid2h	Minimaal 6 weken	143	Beide geslachten	gamma-interferon-knockout mice	IFN gamma -/- (C.129S7(B6)-Ifngtm1Ts/J)

Provide justifications for these choices

Species

Voor de bioassay worden muizen gebruikt. Voor details zie project proposal paragraaf 3.1.

Dit is een internationaal aanvaarde gouden standaard voor het bepalen van de aanwezigheid van levend *T. gondii*. Op dit moment is de muisbioassay de enige methode waarmee onderzocht kan worden of vlees(producten) levende *T. gondii* bevatten of niet.

Origin

Muizen worden verkregen van de proefdierfaciliteit van het 5.1 lid2h (5.1 lid2e). Het FLI heeft een eigen muizenfokkerij voor muizen die gebruikt worden voor het *T. gondii* onderzoek bij het 5.1 lid2h. De muizen worden gehouden "under disease controlled conditions" in een gebouw apart van de onderzoeksfaciliteiten.

Life stages

Minimaal 6 weken oud

Number

143. Zie voor berekening van het aantal de tekst hierboven.

Gender

Beide geslachten zijn geschikt voor deze experimenten

Genetic alterations

Gamma-interferon-knockout muizen (GKO muizen) worden gebruikt in dit project. GKO muizen zijn succesvol gebruikt in eerdere studies waar de muisbioassay werd toegepast. Deze muizen zijn gevoeliger voor een *T. gondii* infecties dan bijv. Swiss Webster muizen die ook wel gebruikt worden voor de *T. gondii* muisbioassay.

Strain

IFN gamma -/- (C.129S7(B6)-Ifngtm1Ts/J)

<https://www.jax.org/strain/002286>

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

C. Accommodation and care

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

1. Om pijn en ongerief te bestrijden zal buprenorphine (0.05 mg/kg muis) op dag -1 tot en met dag 14 worden toegediend aan de muizen via het drinkwater. Het doel van deze toediening is om het ongerief van de eerste infectieresponse te verminderen. Toediening hiervan vermindert het ongerief en pijn maar niet de uitkomst van een acute T. gondii infectie (Lindsay et al., 2005, The Journal of parasitology 91, 1488-1490).
2. Voorafgaand aan euthanasie met bloedafname worden de muizen onder anesthesie gebracht.

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

1. Experimentele handelingen: bloedafname, intra peritoneale injectie met weefsel digest, intra peritoneale injectie voor anesthesie.
2. Muizen kunnen in de eerste drie dagen na de intra peritoneale toediening van weefseldigest een peritonitis ontwikkelen als gevolg van een bacteriële infectie.
3. Muizen kunnen tot \pm 2 weken na de intra peritoneale injectie met weefseldigest ziek worden als gevolg van een T. gondii infectie met als belangrijkste verschijnselen koorts, algehele malaise en vorming van buikvocht (door een combinatie van leverschade en peritonitis).

Explain why these effects may emerge.

1. Kortdurende handelingen als gevolg van de gekozen experimentele opzet.
2. Bij een peritonitis binnen 3 dagen na toediening van het weefseldigest kan er sprake zijn van een bacteriële infectie. Oorzaak hiervan is dat organen en weefsels van de gebruikte schapen bacteriologisch verontreinigd kunnen zijn. Als gevolg daarvan kunnen er ook bacteriën in het weefseldigest aanwezig zijn en ziekte veroorzaken bij de muizen.
3. Muizen kunnen na een intra peritoneale injectie met weefseldigest ziek worden als gevolg van groei van T. gondii tachyzoieten en bijbehorende ontstekingsreacties. Mogelijk worden HEP's bereikt. Zo niet, dan eindigt de acute fase van de infectie na ongeveer twee weken wanneer de tachyzoieten zich naar alle weefsels inclusief de hersenen verspreiden en weefselcysten vormen (Dubey 2009). De weefselcysten blijven latent aanwezig, maar veroorzaken geen ziekteverschijnselen.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

1. Alle handelingen worden uitgevoerd door getrainde biotechnici zodat de handeling op een correcte en snelle manier uitgevoerd wordt.
2. Vaste biotechnici scoren dagelijks de muizen op mogelijke ziekteverschijnselen en ervoor zorgen dat tijdig wordt onderkent wanneer een muis een HEP bereikt. De meeste van deze medewerkers zijn eerder ook al betrokken geweest bij uitvoering van de muisbioassay voor T. gondii tijdens de uitvoering van de voorgaande vergunning. Samen met deze medewerkers is de klinische scoringsmethode ervaring opgedaan.
3. Om te voorkomen dat een muis een bacteriële infectie krijgt als gevolg van toediening van weefseldigest wordt er een antibioticum-cocktail toegevoegd aan het weefseldigest. Deze antibiotica (penicillinstreptomycine, amoxicilline) hebben geen effect op T. gondii.

E. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question F.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

- HEPs worden toegepast als het ongerief van een individuele muis de in dit project beschreven bovengrens overschrijdt.
- De muizen worden geëuthanaseerd ter voorkoming van uitzichtloos of ernstig lijden. Een coderingslijst voor HEPs wordt gebruikt zoals gebruikt in het vorige project (AVD5.1 lid2h) en voor het Toxoplasma EFSA project in 2015 en beschreven in het EFSA rapport van Opsteegh et al., 2016 (www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/995e).

Categorie	Omschrijving	Score
A: Conditie vacht <i>selecteer optie die het meest van toepassing is (max score 2)</i>	Gladde (aansluitende) glimmende vacht	0
	Ruwe (opgezette) vacht	1
	Stijve vacht, blijft opgezet	2
B: Houding/ gedrag <i>meerdere opties tegelijk mogelijk (cumulatieve score, max score 3)</i>	Alert en actief	0
	Ineengedoken en bolle rug tijdens het lopen	1
	Passief tijdens handelingen	1
	Wankelende gang (incoördinatie)	1

Muizen worden geëuthanaseerd als een muis een maximum score heeft bereikt in categorie A (score 2) of B (cumulatieve score 3) of als een muis een totale score van 3 heeft (A+B).

Alle muizen worden één tot drie keer per dag klinisch beoordeeld afhankelijk van de fase van het experiment.

Indicate the likely incidence.

- In 2017 werd de muisbioassay ook uitgevoerd bij 5.1 lid2h in een (vergelijkbaar) eerder project. (AVD5.1 lid2h).
- Van de 102 muizen werden 5 muizen werden dood aangetroffen in de eerste drie dagen na inoculatie, 4 muizen werden dood aangetroffen in de periode van dag 4 - dag 14. Totaal 9 muizen van de 102 (9%).
- Daarnaast voldeden tijdens de proef 60 muizen aan de HEPs en deze muizen werden geëuthanaseerd.
- Op basis van deze getallen verwachten we dat de incidentie 69 (60+5+4) van de 102 (68%) is.
- Als het HEP bereikt wordt voor muizen vanaf dag 4, is het doel van de proef voor de betreffende muis bereikt. De muizen zijn dan voldoende ziek om de uitkomst parameters van een T. gondii infectie te verzamelen. Toepassing van de HEPs gaat niet ten koste van de resultaten uit de proef.
- Als het HEP bereikt wordt voor muizen in de eerste drie dagen na inoculatie dan is het doel van de proef niet bereikt voor die muizen. Om die reden worden deze muizen vervangen door reservemuizen (zie ook hierboven het onderdeel over reservemuizen).

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Fasen in infectie van muizen met T. gondii. De frequentie van de klinische beoordeling is hierop afgestemd.

- Dag 1-3: als muizen in deze periode ziek worden en doodgaan is dat niet als gevolg van een T. gondii infectie. Meest waarschijnlijk is dat dit gebeurt vanwege een bacteriële infectie (vanwege bacteriën in weefseldigest). Om dit zoveel mogelijk te voorkomen wordt een antibioticumcocktail toegevoegd aan

het weefseldigest. Desondanks kunnen er muizen ziek worden en doodgaan. Dagelijks worden de muizen in deze periode drie keer klinisch gescoord.

- Dag 4-14: dit is het tachyzoieten stadium van *T. gondii*. In deze periode kunnen muizen ziek worden de meeste klinische verschijnselen waargenomen. Dagelijks worden de muizen in deze periode drie keer klinisch gescoord.
- Dag 15-42: dit is het weefselcyste stadium van *T. gondii*, er worden amper nog klinische symptomen waargenomen. Dagelijks worden de muizen in deze periode één keer klinisch gescoord.

No.	Procedure	Mate van ongerief	Duur van ongerief/max frequentie	Hoeveel muizen
1	Bloedafname	Licht	1 minuut / 1 keer	143
2	Intraperitoneale infectie met weefseldigest	Licht	1 minuut / éénmalig	143
3	Anesthesie	Licht	1 minuut / éénmalig	143

Ondanks toepassing van de HEPs is in het vorige project gebleken dat er 9% (9 van de 102) muizen stierven omdat ze tussen twee observatiemomenten doodgingen en het humane eindpunt niet op tijd kon worden toegepast. Op basis hiervan wordt dus voor 13 (9%) van de muizen ernstig ongerief verwacht en voor 130 (91%) muizen matig (handelingen die licht ongerief geven i.c.m. met milde klinische verschijnselen) ongerief.

Om ernstig ongerief te voorkomen is het observatieprotocol aangepast van twee keer naar drie keer per dag. Dit is om de muizen intensiever klinisch te beoordelen tijdens de kritische periode (dag 0-14). Door intensivering van toepassing van de HEPs is het de verwachting dat het aantal muizen met ernstig ongerief lager zal zijn dan in het voorgaande project.

G. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement

Zonder de muisbioassay kan op dit moment het doel van het onderzoek (beheersen T. gondii voedselveiligheidsrisico's van rauwe vleeswaren) niet bereikt worden:

1. De muisbioassay is de enige test waarmee levende T. gondii parasieten kunnen worden aangetoond in vlees. In dit project wordt de celkweek als alternatief voor de muisbioassay ontwikkeld en gevalideerd. Dit betekent dat de celkweek en de muisbioassay met elkaar worden vergeleken.
2. Om de muisbioassay te kunnen vervangen wordt in dit project de celkweek ontwikkeld en gevalideerd. De resultaten van de celkweek worden ook al binnen dit project gebruikt en daarmee draagt de celkweek al bij aan het verkrijgen van resultaten.

Reduction

1. In dit project wordt de celkweek ontwikkeld om de voedselveiligheid van rauwe vleeswaren te onderzoeken. Via wetenschappelijke publicaties, lezingen en workshops zullen de resultaten breder onder de aandacht gebracht worden zodat de muisbioassay niet onnodig gebruikt wordt. Dit zal bijdragen aan de reductie van muizen voor deze toepassing. Er zouden mogelijk andere alternatieven kunnen ontstaan op basis van de verkregen resultaten bijv celkweek voor andere detecties binnen het T. gondii onderzoek en die nog met gebeuren.
2. De resultaten van de celkweek worden ook al binnen het project gebruikt waardoor minder herhalingen in de muisbioassay nodig zijn.
3. In dit project worden IFNg knockout muizen gebruikt. Deze dieren raken makkelijker geïnfecteerd, waardoor de test gevoeliger is. Met Swiss Webster zouden mogelijk meer muizen per digest nodig zijn om er zeker te zijn dat er geen levende T. gondii aanwezig is.

Refinement

1. Muizen zijn een goede diersoort gebleken voor een T. gondii infectie. Muizen zijn gevoelig voor T. gondii infecties. In de natuur worden ze ook gemakkelijk geïnfecteerd met T. gondii en als prooi voor de katten is de parasitaire cirkel rond.
2. Vanuit literatuur is bekend dat buprenorphine hydrochloride gemengd met het drinkwater de pijn en ongerief van een T. gondii infectie verminderen. Om die reden wordt buprenorphine hydrochloride via het drinkwater aangeboden.
3. Humane eindpunten zijn gedefinieerd om het ongerief zoveel mogelijk te beperken. Ervaring met het uitvoeren van de muisbioassay leert dat voor 9% van de muizen het ongerief ernstig was (muizen dood gevonden). Door intensivering van de klinische monitoring (van twee naar drie keer per dag) op de HEPs is het de verwachting dat dit aantal sterk gereduceerd wordt.
4. De procesmaatregelen waarvoor uit de celkweek blijkt dat ze weinig effect hebben op de overleving van T. gondii vervallen of worden vervangen.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

I. Repetition Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.n.v.t.

J. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Bloed en peritoneaal vocht of hersenen zullen verzameld worden om serologisch of met de PCR onderzocht te worden om vast te stellen of de muis een T. gondii infectie heeft doorgemaakt.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

De dieren worden gedood met een overdosis anesthesie gevolgd door een cervicale dislocatie.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

n.v.t.

Naam van het project	Bepalen van het effect van zout en andere toevoegingen in rauwe vleeswaren op Toxoplasma gondii met een nieuwe proefdiervrije methode.
NTS-identificatiecode	NTS-NL-449803 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Voedselveiligheid Toxoplasma gondii Celkweek Vleeswaren
Doel(en) van het project	Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Besmettelijke ziekten van de mens

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

<p>Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).</p>	<p>Toxoplasma gondii is een parasiet en deze ziekteverwekker kan voorkomen in rauw gegeten vleeswaren zoals filet americain, ossenworst en rauwe ham. In Nederland staat T. gondii op de tweede plaats na Campylobacter op de ranglijst van 14 door voedsel overgedragen ziekteverwekkers. T. gondii is de veroorzaker van toxoplasmose en vrijwel alle warmbloedige dieren, inclusief mensen kunnen besmet worden. Ongeveer een derde van de wereldbevolking is geïnfecteerd met deze parasiet. Zwangere vrouwen en mensen die door andere ziektes een sterk verminderde afweer hebben vormen de belangrijkste risicogroepen.</p> <p>Ondanks waarschuwingen vanuit de overheid (Voedingscentrum en RIVM) voor de risico's op een T. gondii infectie worden binnen Nederland maar ook wereldwijd veel rauwe vleeswaren gegeten.</p> <p>Het RIVM onderzoekt elk jaar hoeveel mensen ziek worden of sterven aan ziekteverwekkers die via voedsel worden overgedragen. Zij stellen vast dat de ziektelast van T. gondii door het eten van rauwe vleeswaren nog steeds te hoog is. Kennisinstellingen en de vleeswarenindustrie hebben daarom een samenwerkingsverband gevormd om de voedselveiligheid, dus het doden van T. gondii in rauwe vleeswaren, te verbeteren.</p> <p>In dit onderzoek wordt gezocht naar een manier om T. gondii te doden in rauwe vleeswaren. Daarvoor wordt het effect van zout en andere toevoegingen tijdens de bereiding van rauwe vleeswaren bepaald op de afdoding van T. gondii. In een eerdere studie is al gebleken dat het effect van zout groot is op afdoding van T. gondii. Dit onderzoek zullen we vervolgen en nagaan welke minimale concentraties zout en andere toevoegingen voldoende afdoding van T. gondii in vlees opleveren.</p> <p>Om de besmettelijkheid van T. gondii aan te tonen wordt er tot op heden gebruik gemaakt van een dierproef met muizen. In dit project wordt onderzocht of deze dierproef kan worden vervangen door een proefdiervrij alternatief, namelijk een celkweek. In ons onderzoek zal dit alternatief worden getest om te bewijzen dat deze inderdaad een geschikte vervanging is.</p> <p>De doelstellingen van dit project zijn:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Een diermodel met schapen opzetten om voldoende T. gondii besmet vlees te verkrijgen. Op deze
---	--

wijze wordt de werkelijke situatie van T. gondii besmet vlees het beste benaderd.
-Met het verkregen T. gondii positief vlees nagaan welke concentraties van zout en andere toevoegingen T. gondii inactiveren.
-Vergelijken van de T. gondii inactivatie met de testmethode in muizen en met de celkweekmethode.

Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

Zolang consumenten deze rauwe vleeswaren consumeren is er noodzaak om, naast voorlichting over de risico's, voedsel te produceren dat zo veilig mogelijk is. De hoge humane ziektelast van T. gondii maakt het noodzakelijk dat er maatregelen worden genomen om T. gondii infecties in mensen te voorkomen.

Op dit moment zijn er in de vleessector twee bewegingen gaande die het risico op T. gondii in rauwe vleeswaren mogelijk vergroten. Ten eerste is er naast de huidige veehouderij een beweging gaande richting verduurzaming hiervan en die het naar buiten gaan van landbouwhuisdieren stimuleert. Meer buitenloop betekent echter meer risico op een T. gondii besmetting. T. gondii komt voor in het milieu en bijvoorbeeld in de biologisch varkenshouderij komen meer T. gondii infecties voor dan bij varkens die altijd binnen worden gehouden. Ten tweede wordt ernaar gestreefd minder zout in voedingsmiddelen te gebruiken, terwijl juist zout effectief is bij het afdoden van T. gondii. Om die reden is het belangrijk te bepalen hoeveel zout minimaal nodig is.

De resultaten van dit project zullen verder inzicht geven in de optimale concentratie zout die toegevoegd moeten worden om veilige rauwe vleeswaren te produceren. Daarnaast beogen wij dat een potentieel proefdiervrij alternatief voor het aantonen van levende T. gondii in besmet vlees getest kan worden zodat deze de traditionele dierexperimenten voor dit doel kunnen vervangen. Op deze wijze kan er zonder het gebruik van proefdieren het effect van zout en andere toevoegingen op de levensvatbaarheid (of doden) van T. gondii getest worden.

VOORSPELDE SCHADE

In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.

Schape:

- Selectie van een schapebedrijf waar geen T. gondii infecties voorkomen door uitvragen van de abortushistorie, vaststellen of er T. gondii vaccinatie wordt toegepast, afwezigheid van (jonge) katten en geen antilichamen tegen T. gondii in bloed van 10 schape van dit bedrijf. Van 10 schape zal bloed worden afgenomen om vast te stellen of ze ooit een T. gondii infectie hebben doorgemaakt. Alleen wanneer alle 10 schape negatief getest worden dan kunnen deze schape gebruikt worden voor dit project. De afname duurt maximaal 5 minuten.
- 5 geteste schape worden experimenteel besmet met T. gondii door middel van een toediening via de mond. De toediening duurt maximaal 5 minuten
- Bij de 5 schape wordt gedurende 20 weken maximaal 13 keer bloed afgenomen. Een afname duurt maximaal 5 minuten
- Bij de 5 schape wordt gedurende de eerste 2 weken maximaal 7 keer temperatuur gemeten. Een meting duurt maximaal 5 minuten.
- Schape worden aan het einde van het experiment verdoofd en daarna gedood in een steriele sectieruimte om het geïnfecteerde vlees te verkrijgen. Het onder verdoving brengen duurt maximaal 5 minuten.

Muizen:

- Het experiment start met een eenmalige bloedafname van alle dieren. De afname duurt maximaal 1 minuut.
- Daarna wordt via een injectie in de buikholte T. gondii besmet weefsel toegediend (verkregen uit het schapeexperiment). Deze handeling duurt maximaal 1 minuut.
- Dieren worden 42 dagen lang één tot drie keer per dag beoordeeld op klinische symptomen van de besmetting. Deze observaties worden gedaan door de muizen in hun kooi te bekijken. In enkele gevallen worden muizen uit de kooi genomen om ze beter te kunnen bekijken. Deze handeling duurt maximaal 1 minuut.
- Op dag 42, of eerder als de muizen te ziek zijn geworden van de infectie, worden de muizen verdoofd en daarna gedood. Hersenen worden verzameld om te onderzoeken op T. gondii. Mochten de muizen doodgaan in de eerste twee weken, dan wordt ook nog het buikvocht verzameld en onderzocht op T. gondii. Het aantonen van T. gondii in de hersenen of buikvocht duidt op de aanwezigheid van levende en daarom infectieuze T. gondii.

Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?

Zowel de schape als de muizen zullen licht ongerief ondervinden van de handelingen die hierboven zijn beschreven.

De verwachting is dat de schape niet of amper ziek zullen worden na de orale T. gondii infectie. Desondanks worden de dieren dagelijks geobserveerd op mogelijke klinische symptomen zoals ademhalingsproblemen. Als de dieren koorts hebben dan zullen ze koortswerend middel krijgen om het ongerief te verlichten.

Een deel van de muizen kunnen in de eerste drie dagen na de toediening van T. gondii weefsel een buikvliesontsteking ontwikkelen als gevolg van een bacteriële infectie afkomstig uit het toegediende weefsel. Muizen kunnen daarnaast tot ± 2 weken na de toediening van T. gondii weefsel ziek worden als gevolg van deze infectie met als belangrijkste verschijnselen koorts, algehele malaise en vocht in de buikholte. Door de muizen in die periode zeer intensief te observeren met behulp van een experiment-specifieke klinische scoringsmethode worden te zieke dieren vroegtijdig uit het experiment genomen en gedood. Dieren krijgen de eerste dagen na infectie drinkwater met pijnstilling om het ongerief van de infectie te verminderen.

Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?

Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad			
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig
Schape (Ovis aries)	10	0	0	10	0
Muizen (Mus musculus)	143	0	0	130	13

Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?

Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren		
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd
Schapen (<i>Ovis aries</i>)	0	5	0

Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.

5 schapen zullen worden gedood om *T. gondii* besmet vlees te verkrijgen
 143 muizen zullen gedood worden om in hersenen en in sommige gevallen in het buikvocht vast te stellen of de muis een *T. gondii* infectie heeft doorgemaakt.

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

Schape: Schape zijn nodig om geïnfecteerd vlees te verkrijgen voor de experimenten en kunnen niet worden vervangen. In de laatste sectie van de NTS (keuze van de diersoort) wordt dit uitgelegd.

Muizen: Een belangrijk deel van dit project is het vervangen van de muizen experimenten om levende T. gondii aan te tonen in vlees.

In het vorige project is een celweek ontwikkeld die na optimalisatie de muizen experimenten zou kunnen vervangen. Om dit vast te stellen zullen de muizenexperimenten en de celweek eerst met elkaar vergeleken moeten worden. Dit is één van de doelstellingen van dit project. Als de T. gondii detectie met de celweek vergelijkbare resultaten oplevert als de uitkomsten uit de muizenexperimenten dan kan de celweek als proefdiervrij alternatief dienen voor toekomstige projecten met T. gondii.

2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Schape: De eerste stap is om vast te stellen of het schape infectiemodel werkt. Hiervoor worden twee schape gebruikt. Als dit niet blijkt te werken dan zullen wij de geplande experimenten met de overige drie schape niet uitvoeren. Door deze strategie worden zo min mogelijk schape gebruikt.

Muizen: Op basis van de resultaten van onze vorige studie was het mogelijk om een betere berekening te maken van het benodigde aantal muizen voor dit experiment. Doordat zowel de resultaten uit de celweek als de resultaten uit de muisproef worden gebruikt om het effect van zout te bepalen zijn minder bepalingen met de muisproef nodig.

3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

Schape: Er mogen geen T. gondii infecties zijn op het bedrijf waar de schape aanvankelijk gehuisvest zijn. Om vast te stellen welke schape geschikt zijn voor dit project zullen we één bloedafname doen die plaatsvindt op de boerderij waar de dieren gehuisvest zijn. Wanneer alle schape negatief getest worden op T. gondii, dan is het bedrijf geschikt en kunnen de geteste schape gebruikt worden. Schape, afkomstig van een bedrijf dat niet geschikt is zullen niet onnodig worden vervoerd en blootgesteld aan andere experimentele handelingen.

Muizen: Bij de muizenexperimenten hebben we in onze vorige studie gezien dat muizen tot en met de eerste twee weken snel ziek kunnen worden. We hebben op basis van die ervaring onze experiment-specifieke-klinische-scoringsmethode aangepast. Dit betekent dat we de dieren intensiever monitoren, namelijk van twee naar drie keer per dag gedurende de meest kritische periode (de eerste twee weken). We verwachten dat door deze aanpassingen het humane eindpunt voor zieke muizen nog beter kan worden toegepast.

Zowel bij de muizen als bij de schape zal pijnstilling of een ontstekingsremmend middel worden toegediend om mogelijke ongerief van de infectie te verlichten.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

Schape: In het voorgaande project is getracht geïnfecteerd vlees te verkrijgen door middel van slachthuis materiaal (schape harten). Schape werden geselecteerd omdat bekend is dat de besmettingsgraad van T. gondii bij schape hoog is. Uit dit materiaal was echter niet genoeg besmet vlees met voldoende levende T. gondii parasieten te verkrijgen voor verder onderzoek. Om deze reden worden in dit project 5 schape experimenteel geïnfecteerd. Schape worden gemakkelijk

geïnficeerd met *T. gondii*. Op grond van literatuur is de verwachting dat de concentratie bij deze experimenteel geïnficeerde dieren hoog genoeg zal zijn.

Muizen: In deze studie is het van belang om het effect van zout en andere toevoegingen op de levensvatbaarheid van *T. gondii* te bepalen. Hierbij dient een onderscheid gemaakt te worden tussen levende en dode *T. gondii*. Er is dus een test nodig waarmee levende *T. gondii* kan worden aangetoond. Daar wordt de muis voor gebruikt. Dit is de 'gouden standaard' en de enige internationaal aanvaarde methode voor het bepalen van de aanwezigheid van levende *T. gondii* in vlees.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	30-09-2027
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	ja
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	



Advies aan CCD

B

Datum 20 juli 2021

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202115002

Instelling:

5.1 lid2h

Onderzoeker:

5.1 lid2e

Project:

Verbetering voedselveiligheid door (1) ontwikkeling en validatie van de celkweek voor aantonen van levende *Toxoplasma gondii* parasieten in vlees als alternatief voor de muisbioassay en (2) bepalen van het effect van zout en andere toevoegingen in rauwe vleeswaren op *T. gondii* hiermee

Aanvraagnummer:

AVD202115002

Betreft:

Nieuwe aanvraag

Categorieën:

Transitioneel of toegenast onderzoek

Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces

De volgende vragen zijn Log gesteld aan de aanvrager.

5.2 lid1

1) U geeft aan dat vanuit de literatuur bekend is dat 2% zout *T. gondii* afdoort. Wij begrijpen dat u als een positieve controle een concentratie van 3% zout mee wilt nemen in uw dosistitratie. Het is ons echter niet volledig duidelijk waarom dan ook nog 2,4% en 2,7% moet worden meegenomen. Dit zal volgens recept zijn van een vleeswarenfabricant, maar het is niet duidelijk wat gebruik van 3 dosislevels boven de 2% toevoegt aan de resultaten.

2) Begrijpen wij het goed dat u in eerdere experimenten met de muis-bioassay ook dosistitratiecurves met zout heeft uitgevoerd. Kunt u aangeven waarom dit nu opnieuw nodig is?

3) Het is niet volledig duidelijk of de celkweek en de muis-bioassay gelijktijdig plaatsvinden, en of hier go/no go beslismomenten tussen kunnen worden ingevoegd. Graag dit verhelderen.

Overzicht van opmerkingen bij 10. AdviesNotaCCD - 5.1 lid2e _met opmerkingen.pdf

Pagina: 1

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 22-7-2021 11:42:14
weghalen (of vervangen door kunnen gesteld worden).

Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-7-2021 11:41:40
5.2 lid1

Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-7-2021 10:47:12
In de vragensectie van het DEC advies staat het volgende, had je dat al gelezen? 5.2 lid1
aangezien het doel is om de zoutconcentratie te verminderen in voedsel:

U wil bepalen in welke mate verschillende zouten T. gondii afdoden en infecties kunnen voorkomen. Hiertoe kijkt u naar een range van zoutconcentraties, tot wel 3.0%.

Hoe rechtvaardigt u dergelijke hoge zoutconcentraties als we in Nederland – en elders – toch in een trend zitten naar minder zout in ons eten, vanwege gezondheidsredenen. Mocht de hoogste zoutconcentratie de sterkste reductie in T. gondii geven, hoe realistisch is het dat een dergelijk receptuur ook daadwerkelijk gebruikt kan gaan worden in de praktijk?

Het klopt dat de levensmiddelenindustrie werkt aan verlaging van zout in voeding, ook in vleeswaren.

Bij het opstellen van de 16 procesmaatregelen is gebruik gemaakt van de huidige recepturen van vier bij dit project betrokken vleeswarenfabrikanten. De zoutreeks is in overleg met hen vastgesteld.

In filet americain is de zoutconcentratie meestal tussen 1,2 en 1,8%, maar kan ook 2.5% zijn. Vanuit literatuur is bekend dat 2 % zout T. gondii afdood. Dus een zoutconcentratie van 3% zou zeker effectief moeten zijn. Een volledig effectieve zoutconcentratie is een belangrijke controle in de experimenten en nodig voor de modellering van het effect van zout.

We wijzen er op dat dit project van waarde is voor de vleeswarenindustrie omdat duidelijk wordt hoeveel zout er nodig is om T. gondii in rauwe vleeswaren af te doden. Juist in het licht van de trend naar vermindering van zout is onderdosering een risico en moet overdosering worden voorkomen.

Deze tekst hebben we toegevoegd aan de beschrijving van de strategie in 3.4.2 van het project proposal (blz 16/18) onder het kopje 'Lijst met procesmaatregelen'.

	<p>4) Het is ons niet duidelijk waarom van de geïnfecteerde schapen wekelijks een bloedmonster moet worden afgenomen, als deze dieren enkel gebruikt worden voor de 'productie' van geïnfecteerd vlees. Het lijkt er niet op dat dieren die al voldoende hoge antilichaamtiter hebben eerder zullen worden gedood. Kunt u verhelderen waarom deze meerdere bloedmonsters nodig zijn?</p> <p>5) De schapen worden in eerste instantie bij het bedrijf van herkomst bemonsterd. Indien de schapen bij deze bedrijven niet volgens de EU-richtlijn 2010/63 worden gehuisvest, dan zou dit bij vraag C moeten worden benoemd.</p> <p>Bij de schapen is niet vermeld dat de dieren in eerste instantie op het bedrijf van herkomst worden bemonsterd.</p>			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen				
	Schapen (<i>Ovis aries</i>)		10	Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn
3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	IFN gamma -/-	143	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Locatie niet bij instelling

3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen

Citaat: Op een regulier commercieel schapenbedrijf wordt bloed van schapen afgenomen voor screening.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen

Schapen (*Ovis aries*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Geen voorkeur voor geslacht, afhankelijk van beschikbaarheid.

3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay

Muizen (*Mus musculus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	<ul style="list-style-type: none"> - Niet alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. Hierboven een overzicht. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	---

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaat C4 (directe en uiteindelijke doelen): (...) De DEC heeft, bij meerderheid van stemmen, vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen de directe en uiteindelijke doelstellingen en dat de directe doelen gerechtvaardigd zijn binnen de context van het onderzoeksveld.</p> <p>Citaat C8 (onderzoeksopzet): Een meerderheid van de DEC is van mening dat, na beantwoording van de eerdere vragen en aanpassing van het project, het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. Enkele leden van de DEC hebben hun bedenkingen uitgesproken. Het DEC advies is dan ook geen unaniem advies. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in de ogen van de meerderheid van de DEC-leden leiden tot het behalen van de doelstelling(en) binnen het kader van het project.</p> <p>Eén lid van de DEC vindt de toepasbaarheid niet duidelijk. Het celkweekstelsel kan straks worden gebruikt om de effectiviteit van andere vleesbewerkingsmethoden te onderzoeken. Het is niet duidelijk of het celkweekstelsel ook breder inzetbaar is in de praktijk: de pathogenese van <i>T. gondii</i> is al uitgebreid bestudeerd, en voor routinmatig gebruik is de celkweekmethode niet geschikt zoals de onderzoeker eerder heeft vermeld. .</p> <p>Een ander DEC-lid weet niet waarom men wil testen met 3% zout als vanuit de literatuur bekend is dat 2% al voldoende is om <i>T. gondii</i> te doden. Ga je hier niet onnodig dieren voor inzetten en waarvoor? Wat is de noodzaak voor 2,4, 2,7 en 3%? In de DEC wordt vervolgens opgemerkt dat de concentraties en aantallen groepen nog niet geheel vast staan. De onderzoeker geeft daar echter geen vervolg aan. Men zou verwachten dat er dan go/no go's geformuleerd zouden zijn wanneer men wel of niet gaat testen in muizen, te meer daar de onderzoeker aangeeft dat men de dierproeven zoveel mogelijk wil verminderen.</p> <p>Een derde DEC-lid kan uit het voorstel niet opmaken of het nu om de ontwikkeling van een diermodel gaat of om een infectie-experiment. Als het doel is: de ontwikkeling van een diermodel is (een diermodel opzetten om onder experimentele omstandigheden voldoende <i>T. gondii</i> besmet weefsel te verkrijgen.), vraagt dit DEC-lid zich af of dat doel met de huidige opzet bereikt kan worden. Op basis van de huidige opzet, komt men in de ogen van dit DEC-lid niet tot een diermodel.</p> <p>Ook is dit DEC-lid van mening dat wanneer de onderzoeker schrijft dat</p>
-------------------	---

"hartweefsel van schapen onvoldoende geschikt was omdat het aantal weefselcysten te laag was en niet homogeen verdeeld was maar ook dat van schapenharten uit het slachthuis niet bekend is of het geïnfecteerd was met T. gondii en hoe hoog de concentratie van bradyzoieten was" dit perspectief biedt. Bloed van schapen kan dan serologisch onderzocht worden en aangezien schapen vaak een paar dagen afhangen in het slachthuis zouden de positief gebleken karkassen alsnog gebruikt kunnen worden. Dit DEC-lid vraagt zich ook af waarom gekozen is voor 20 weken oude lammeren terwijl de meeste klinische verschijnselen bij (drachtige) eersteworpsooien wordt gezien.


Citaat C10 (huisvesting): De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Echter, bij de muizen ontbreekt of de dieren in groepen of individueel gehuisvest worden. Bij de schapen is niet vermeld dat de dieren in eerste instantie op het bedrijf van herkomst worden bemonsterd.

Citaat C14 (vervanging): De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Er wordt in dit projectvoorstel gepoogd om proefdiergebruik in de toekomst te vervangen door een celkweekmethode ter detectie van levende T. gondii parasieten in rauw vlees of vleesproducten.

Een van de DEC-leden merkt op dat de onderzoekers de muizenassay in het verleden al hebben gebruikt. Waarom er nu (weer?) een dosistitratie uitgevoerd moet worden in de muizen is voor dit DEC-lid onvoldoende duidelijk gemaakt .

In de vergadering is gediscussieerd dat het in het onderzoek niet om numerieke waarden zoals titer gaat maar dat men onder dezelfde omstandigheden een muisbioassay wil vergelijken met een celkweekmethode. Dan is het de vraag waarom je een dosis-titratie zou willen doen. **1** Het is een aantal DEC-leden verder niet duidelijk of er nu wel of niet een gestandaardiseerde muisassay is en of die nu alleen voor het eigen lab is. En hoe is dan de vergelijking met andere labs?

Citaat C16 (verfijning): De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. Mede door het gebruik van HEP's kan het ongerief van de dieren zo veel mogelijk beperkt blijven tot matig. Eerder onderzoek heeft doen besluiten de controlefrequentie te intensiveren in een bepaalde periode. Hoewel niet van invloed op de cumulatieve mate van ongerief vraagt de DEC zich af of er volstaan kan worden met minder bloedafnames bij de schapen aangezien het daar toch enkel gaat om het verkrijgen van positief vlees?

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 22-7-2021 11:04:56
Dit is misschien ook belangrijk om uit te vragen, als je de resultaten wilt kunnen generaliseren 5.2 lid1
)

De DEC vindt dat dat met minder bloedafnames vastgesteld kan worden. De motivatie om wekelijks bloed af te nemen, ten behoeve van serologisch onderzoek, is niet duidelijk. Wanneer men bijvoorbeeld de duur van het experiment zou willen verkorten, door de dieren te seceren zodra een voldoende hoge antistof titer is bereikt, dan zou de DEC dat kunnen begrijpen, maar dat is in dit project geen optie. In de ogen van de DEC zou dan 1 of 2 keer bloedafname voldoende moeten zijn. Vermindering van de bloedafnamemomenten zou een verfijning kunnen opleveren.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat:

1. De centrale morele vraag van het project is: Weegt het doel, nl. het pogen vergroten van de voedselveiligheid door beheersing van T. gondii risico's in rauwe vleeswaren door aanpassingen van procesmaatregelen (o.a. het toevoegen van zout) te onderzoeken en zo nodig te optimaliseren en de traditionele muisbioassay pogen te vervangen door een proefdier vrij alternatief, namelijk de celweek methode, zodat procesmaatregelen voor de bereiding van vleeswaren in het laboratorium getest kunnen worden en dit niet meer hoeft in een dier, op tegen het maximaal matige ongerief (m.u.v. de dieren die dood gaan voor een HEP toegepast kan worden; die ondervinden ernstig ongerief) van maximaal 143 muizen en 10 schapen?

2. De meerderheid van de DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft in haar afweging meegewogen dat, wanneer het project zijn uiteindelijke doel haalt dit een bijdrage kan leveren het verminderen van proefdiergebruik t.b.v. toxoplasma-detectie.

De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade-baten-analyse:

- De onderzoekers hebben een reëel wetenschappelijk belang. Er is sprake van kennis vergaren. De DEC waardeert dit als een belang van beperkte morele waarde.
- De CRO heeft naast bovengenoemd reëel wetenschappelijk belang van beperkte morele waarde ook een economisch voordeel bij dit onderzoek omdat het in opdracht uitgevoerd wordt. De DEC waardeert dit als een belang van beperkte morele waarde.
- De vleeswarenssector heeft er een economisch belang bij dat zij veilige producten, (tegen een zo laag mogelijke kostprijs) kunnen verkopen aan de consument. De meerderheid van de DEC waardeert dit als een reëel belang van beperkte morele waarde.
- De maatschappij/consument heeft een reëel gezondheidsbelang bij de wetenschap dat de vleesproducten die zij eten veilig zijn. De DEC

waardeert dit als een belang van reële morele waarde.

- De overheid heeft er een reëel belang bij wanneer zij door regelgeving beleid kan maken dat voedselveiligheid van vleesproducten voor de consument garandeert. De DEC waardeert dit als een belang van reële morele waarde.
- Toekomstige proefdieren kunnen voordeel hebben wanneer er een dierproefvrij alternatief voor de huidige muisbioassay ontwikkeld wordt. De DEC waardeert dit als een reëel belang van grote morele waarde.
- Tot slot zijn de waarden van de proefdieren in dit project in het geding. Zij ervaren grotendeels maximaal matig ongerief en voor ca. 10% ernstig ongerief als gevolg van de handelingen binnen het project. De integriteit van de proefdieren in dit project wordt niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef. De DEC waardeert het belang van de proefdieren als een reëel belang van grote morele waarde.

3. Op basis van bovenstaande overwegingen is de meerderheid van de DEC (7 van de 10 leden) van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar de ontwikkeling en validatie van de celkweek voor aantonen van levende *Toxoplasma gondii* parasieten in vlees als alternatief voor de muisbioassay en het bepalen van het effect van zout en andere toevoegingen in rauwe vleeswaren op *T. gondii* met maximaal matig ongerief voor maximaal 140 dieren en maximaal ernstig ongerief voor maximaal 13 muizen. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging en vermindering van het aantal dieren. De DEC ziet wel mogelijkheden op het terrein van verfijning van de aanvraag.

Twee DEC-leden twijfelen aan de haalbaarheid van de doelstelling om reden zoals onder C.8 beschreven. Eén van deze twee DEC-leden heeft ook twijfels over de te testen procesmaatregelen. Dit DEC-lid is van mening dat al bekend is dat invriezen uiterst effectief is maar nauwelijks ingezet wordt omdat dit economisch niet rendabel is. Dit DEC-lid ziet het als een ethisch probleem dat nieuwe methoden enkel om economische redenen ontwikkeld worden. Eén van deze twee DEC-leden ziet niet als doel het ontwikkelen van een dierproefvrije methode en is van mening dat het hier gaat om het uitvoeren van een infectie-experiment. Een van de DEC-leden geeft aan dat hij niet kan inschatten hoe realistisch het is dat de weefselkweek gevoeliger wordt dan de muisbioassay en om die reden niet goed tot een ethische afweging kan komen.

Voor een ander DEC-lid is het belangrijk dat er duidelijkheid komt over de te testen concentraties. Wanneer hier een bevredigend antwoord op komt kan dit DEC-lid tot een positief advies over gaan.

Samenvattend kan de centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord

worden door 7 leden van de DEC. 3 leden van de DEC beantwoorden de centrale morele vraag op dit moment met "nee".

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

De DEC heeft vragen gesteld over o.a.:

- Waarom de celkweek, die eerder onvoldoende sensitief was, nu wel voldoende sensitief zou kunnen zijn.

- De noodzaak om schapen te infecteren met toxoplasma.

- Onderbouwing waarom toevoegen van parasieten aan vlees waar het niet in zit, niet mogelijk is.

- Nadere toelichting welke bredere toepassing van de T. gondii celkweekmethode in de toekomst in de praktijk kan ontstaan, en hoe deze methode/strategie proefdierbesparend is.

- Onderbouwing waarom alle 16 inactivatieprocessen ook in de muizen getest moeten worden?

- Effect van de toevoeging van zout, natriumacetaat of natriumlactaat effect op de celcultuur.

- Verheldering waarom de detectielimiet van de muisbioassay nog moet worden bepaald.

- Nadere duiding van het vervolg als de detectielimiet van de celkweekmethode hoger ligt dan die van de muis-assay.

- Mogelijkheden vermindering/verfijning/go-no go.

- Mogelijkheid gebruik kweekvlees

- Onderbouwing range van zoutconcentraties en transleerbaarheid

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Drie van de tien DEC leden is van mening dat het doel van deze aanvraag niet opweegt tegen het ongerief dat de 143 muizen en 10 schapen wordt aangedaan.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

De CCD waardeert het dat u duidelijk het standpunt van de verschillende DEC leden heeft weergegeven, en welke vragen nog leven bij de DEC.

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling

Doelstelling

Citaat:

Hoofddoelstellingen

1. Het vergroten van de voedselveiligheid door beheersing van T. gondii risico's in rauwe vleeswaren. Dit doel wordt bereikt door het effect van huidige procesmaatregelen (o.a. het toevoegen van zout) op de bereiding van rauwe vleeswaren te bepalen en zo nodig verder te optimaliseren.
2. De traditionele muisbioassay wordt vervangen door een proefdiervrij alternatief, namelijk de celkweek methode, zodat procesmaatregelen voor de bereiding van vleeswaren in het laboratorium getest kunnen worden en dit niet meer hoeft in een dier.

Subdoelstellingen

1. Optimaliseren van de celkweek
 2. Een diermodel opzetten om onder experimentele omstandigheden voldoende T. gondii besmet weefsel te verkrijgen.
 3. Met het verkregen T. gondii vlees nagaan welke concentraties van zout en andere additieven T. gondii inactiveren en daarmee de vleeswaren veiliger maken. Deze tests worden in eerste instantie uitgevoerd met behulp van de celkweek.
 4. Confirmatie van de resultaten verkregen met de celkweek (subdoel 3) met de muisbioassay.
- De muisbioassay is de 'gouden standaard'. De resultaten van afdoding van T. gondii door procesmaatregelen zal getest worden in de celkweek en vergeleken worden met de muisbioassay.

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat:</p> <ul style="list-style-type: none"> • T. gondii wordt nationaal en internationaal erkend als een belangrijke voedselpathogeen (zie sectie 3.1). De hoge humane ziektelast maakt het noodzakelijk dat er maatregelen worden genomen om T. gondii infecties te voorkomen. • Ook wordt breed erkend dat beheersing van T. gondii risico's van rauw geconsumeerde vleesproducten gewenst is (zie ook sectie 3.1) • Voor de vleeswarenssector is het urgent en belangrijk om te weten of de huidige procesmaatregelen voor de bereiding van rauwe vleeswaren, eventueel met kleine aanpassingen van de receptuur, voldoende zijn om het risico voor de consument te beheersen. • De overheid neemt maatregelen om de veehouderij diervriendelijker en duurzamer te maken. <p>Verduurzamen van de veehouderij betekent waarschijnlijk ruimte voor het natuurlijke gedrag van koeien, varkens en kippen en zorg voor hun specifieke behoeften en daarmee wordt buitenloop gestimuleerd. Meer buitenloop van dieren betekent meer risico op een T. gondii besmetting. T. gondii oöcysten komen voor in het milieu en bijvoorbeeld in de biologische varkenshouderij hebben varkens de mogelijkheid om buiten te lopen. Juist bij deze varkens komen meer T. gondii infecties voor (Kijlstra et al., 2004).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Er is al meerdere jaren extra aandacht voor de hoeveelheid zout in voedingsmiddelen. De Gezondheidsraad beveelt aan om het gebruik in Nederland te beperken ter voorkoming of terugdringing van een hoge bloeddruk en ter vermindering van de kans op hart- en vaatziekten (Gezondheidsraad, 2015). Nederlandse vleeswarenproducenten werken aan het verder terugdringen van de zoutgehalten in hun producten. Dit project is van waarde voor de vleeswarenindustrie omdat duidelijk wordt hoeveel zout er nodig is om T. gondii in rauwe vleeswaren af te doden. De verworven kennis van dit project kan gebruikt worden om onder- of overdosering te voorkomen. • Het risico van T. gondii in rauwe vleeswaren heeft de aandacht van de Nederlandse overheid, deze heeft vragen gesteld aan de vleeswarenssector over de preventie van T. gondii risico's in rauwe vleeswaren. • De ontwikkeling van een in vitro methode als vervanging van de muisbioassay is voorwaardenscheppend voor de hoofddoelstelling, namelijk zorgen dat rauw geconsumeerde vleeswaren veiliger worden. • De evaluatie van procesmaatregelen voor beheersing van T. gondii risico's in rauw gegeten vleeswaren en eventueel het aanpassen hiervan.
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	De doelstelling is helder verwoord.

Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	Citaat uit DEC advies C7: De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, mede afgaande op het geschreven projectvoorstel en het al ervaring hebben op dit onderzoeksgebied voldoende is gewaarborgd. Verder is er een breed samenwerkingsverband met de vleeswarenssector en andere belanghebbende instellingen. Het Secretariaat heeft geen reden te twifelen aan de kwaliteit van het onderzoek of de onderzoeksgroep.
---	---

3V's

Vervanging

3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen: Citaat:

Zonder infectie van deze schapen kan het doel van het onderzoek (beheersen T. gondii ¹ voedselveiligheidsrisico ²) niet bereikt worden.


1. Er is T. gondii besmet vlees nodig voor het uittesten van de verschillende procesmaatregelen en valideren van de celkweek als alternatief voor de muisbioassay. In het eerste project is geprobeerd om de procesmaatregelen uit te voeren met harten van schapen, verkregen in het slachthuis. Dit bleek echter een niet begaanbare weg omdat er onvoldoende positief materiaal werd verkregen (zie paragraaf 3.1 van het project proposal). De verwachting is dat door een experimentele infectie wel voldoende positief materiaal verkregen wordt. In een experimentele studie is de infectiegraad beter te sturen en dat maakt de kans op succes groter.

2. Een mogelijkheid om T. gondii positief vlees te verkrijgen is door het toevoegen van ² weefselcysten ³ gemalen vlees. Echter, dit is een artificiële situatie en om de effectiviteit van de procesmaatregelen te kunnen testen is het gewenst om uit te gaan van vlees van een dier dat met T. gondii geïnfecteerd is omdat dit de werkelijkheid het beste benadert. Verder kunnen weefselcysten die in vlees aanwezig zijn mogelijk anders op de additieven reageren dan vrije weefselcysten die aan gemalen vlees worden toegevoegd. Voor het verkrijgen van weefselcysten is bovendien een dierproef nodig omdat weefselcysten alleen uit levende dieren verkregen kunnen worden.

3. Preventie van T. gondii infecties in dieren door een andere manier van dierhouderij met meer buitenloop van dieren is geen optie, buitenloop heeft eerder een averechts effect op T. gondii infecties in dieren. Vanwege de verspreiding van T. gondii in het milieu is het bijkans onmogelijk dat dieren (waaronder vooral runderen en schapen) die buiten lopen geen infectie met T. gondii oplopen. Preventie van T. gondii infecties in dieren door een strikt hygiëne regime waarbij de dieren niet meer buiten kunnen komen zou de T. gondii risico's verminderen. In de varkenshouderij in Nederland worden de meeste varkens gehouden onder gecontroleerde huisvestingscondities zonder buitenloop. Daardoor zijn de T. gondii risico's op deze bedrijven gemakkelijker te beheersen dan op schapen- en runderbedrijven waar dieren veel buiten zijn en dus geïnfecteerd kunnen raken met T. gondii. Een striktere hygiëne betekent ook dat welzijn van dieren daardoor in gedrang komt.

Pagina: 11


 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-7-2021 11:10:31
enter


 Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-7-2021 11:10:04
enter


3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay: Citaat:
Zonder de muisbioassay kan op dit moment het doel van het onderzoek (beheersen T. gondii voedselveiligheidsrisico's van rauwe vleeswaren) niet bereikt worden:

1. De muisbioassay is de enige test waarmee levende T. gondii parasieten kunnen worden aangetoond in vlees. In dit project wordt de celkweek als alternatief voor de muisbioassay ontwikkeld en gevalideerd. Dit betekent dat de celkweek en de muisbioassay met elkaar worden vergeleken.
2. Om de muisbioassay te kunnen vervangen wordt in dit project de celkweek ontwikkeld en gevalideerd. De resultaten van de celkweek worden ook al binnen dit project gebruikt en daarmee draagt de celkweek al bij aan het verkrijgen van resultaten.

Pagina: 12

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-7-2021 11:10:37
enter

 Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-7-2021 11:11:40
enter

 Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-7-2021 11:10:43
enter

Verminderen	
	<p>3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen: Citaat:</p> <p>1. Het geïnfecteerde schapenvlees wordt gebruikt voor twee doelstellingen: 1) vervangen van de muisbioassay door een in vitro alternatief en 2) om de huidige procesmaatregelen voor de bereiding van rauwe vleeswaren te evalueren en indien nodig aan te passen. Op zich zouden beide doelstellingen in twee aparte projecten en los van elkaar uitgevoerd kunnen worden. In dit project opzet worden ze gecombineerd waardoor minder dieren nodig zijn.</p> <p>2. De eerste vraag die beantwoord zal worden in dit project is of er met een experimentele infectie van schapen voldoende T. gondii positief vlees verkregen kan worden om de procesmaatregelen te testen. Bij het eerste project werden harten van schapen uit het slachthuis gebruikt. Het bleek dat de concentratie van T. gondii parasieten in deze harten te laag was om de procesmaatregelen te testen. Dit is dus een kritisch onderdeel van het project en daarom is als subdoel 2 opgenomen of er voldoende T. gondii parasieten in het vlees aanwezig zijn en of het challenge model leidt tot het verkrijgen van voldoende T. gondii geïnfecteerd vlees. Wanneer het antwoord op deze vragen 'ja' is dan worden pas de volgende schapen geïnfecteerd met T. gondii.</p>
	<p>3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay: Citaat:</p> <p>1. In dit project wordt de celkweek ontwikkeld om de voedselveiligheid van rauwe vleeswaren te onderzoeken. Via wetenschappelijke publicaties, lezingen en workshops zullen de resultaten breder onder de aandacht gebracht worden zodat de muisbioassay niet onnodig gebruikt wordt. Dit zal bijdragen aan de reductie van muizen voor deze toepassing. Er zouden mogelijk andere alternatieven kunnen ontstaan op basis van de verkregen resultaten bijv celkweek voor andere detecties binnen het T. gondii onderzoek en die nog met muizen gebeuren.</p> <p>2. De resultaten van de celkweek worden ook al binnen het project gebruikt waardoor minder herhalingen in de muisbioassay nodig zijn.</p> <p>3. In dit project worden IFNg knockout muizen gebruikt. Deze dieren raken makkelijker geïnfecteerd, waardoor de test gevoeliger is. Met Swiss Webster zouden mogelijk meer muizen per digest nodig zijn om er zeker te zijn dat er geen levende T. gondii aanwezig is.</p>

Verfijnen	
	<p>3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen: Citaat:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Bij de keuze van het aantal schapen is er op gelet om te voorkomen dat de schapen solitair worden gehuisvest. Dus dat er minimaal twee dieren bij elkaar lopen. 2. Er zijn weinig klinische symptomen te verwachten en bij koorts worden NSAIDs gebruikt.
	<p>3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay: Citaat:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Muizen zijn een goede diersoort gebleken voor een T. gondii infectie. Muizen zijn gevoelig voor T. gondii infecties. In de natuur worden ze ook gemakkelijk geïnfecteerd met T. gondii en als prooi voor de katten is de parasitaire cirkel rond. 2. Vanuit literatuur is bekend dat buprenorphine hydrochloride gemengd met het drinkwater de pijn en ongerief van een T. gondii infectie verminderen. Om die reden wordt buprenorphine hydrochloride via het drinkwater aangeboden. 3. Humane eindpunten zijn gedefinieerd om het ongerief zoveel mogelijk te beperken. Ervaring met het uitvoeren van de muisbioassay leert dat voor 9% van de muizen het ongerief ernstig was (muizen dood gevonden). Door intensivering van de klinische monitoring (van twee naar drie keer per dag) op de HEPs is het de verwachting dat dit aantal sterk gereduceerd wordt. 4. De procesmaatregelen waarvoor uit de celkweek blijkt dat ze weinig effect hebben op de overleving van T. gondii vervallen of worden vervangen.
3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen: Voldoende beschreven.	
3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay: Voldoende beschreven.	

Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
------------	--

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen	HEP: <1%	Citaat: <ul style="list-style-type: none"> • Twee dagen 41°C en reageert niet op een koortsremmend middel. OF <ul style="list-style-type: none"> • Eet en drinkt niet en is sloom. Is, ondanks eventuele toediening van medicatie, gedurende 24 uur niet in staat om zelfstandig naar de eet- of drinkbak te gaan. OF <ul style="list-style-type: none"> • Normale ademhalingsfrequentie voor schapen is 20 à 30 per minuut. Het HEP wordt bereikt als de ademhalingsfrequentie drie keer zo hoog (80 à 90 per minuut) gedurende 24 uur.
Schapen (<i>Ovis aries</i>)	Ongerief: Matig	
3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay	HEP: incidentie 69 (60+5+4) van de 102 (68%) is	Citaat: <ul style="list-style-type: none"> • HEPs worden toegepast als het ongerief van een individuele muis de in dit project beschreven bovengrens overschrijdt. • De muizen worden geëuthanaseerd ter voorkoming van uitzichtloos of ernstig lijden. Een coderingslijst voor HEPs wordt gebruikt zoals gebruikt in het vorige project (AVD 5.1 lid2h) en voor het Toxoplasma EFSA project in 2015 en beschreven in het EFSA rapport van Opsteegh et al., 2016 (www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/995e). In de bijlage dierproeven is onder vraag E een tabel toegevoegd met scores voor conditie vacht, en houding/gedrag, en maximale scores waarbij een HEP wordt bereikt.
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	Ongerief: 9,0% Ernstig 91,0% Matig	

5 Samenvatting

5.2 lid1

Deze aanvraag is een vervolg op een eerdere vergunning 5.1 lid2h. De aanvrager heeft onder vraag 3.1 van het projectvoorstel duidelijk weergegeven wat de opbrengsten van dit vorige project waren, en welke

Pagina: 15

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-7-2021 11:14:43

nog toevoegen:

Als het schaap aan één van deze drie HEPs voldoet, dan zal het schaap geëuthanaseerd worden om verder lijden van het schaap te voorkomen.

Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 22-7-2021 11:18:22

100%?

Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-7-2021 11:22:23

Alle muizen worden één tot drie keer per dag klinisch beoordeeld afhankelijk van de fase van het experiment.

is dit ook niet relevant om te benoemen?

Nummer: 4 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-7-2021 11:40:24

Nog even benoemen dat 9% van de muizen ernstig ongereif zal ondergaan en dat daarom een beoordeling achteraf geboden is.

vragen nog niet beantwoord zijn. **5.2 lid1**

5.2 lid1

Eén DEC lid heeft twijfels bij de toepasbaarheid van het project, met name gericht op de bredere inzetbaarheid van het celkweekstelsel in de praktijk. De DEC heeft hier een vraag over gesteld, het antwoord van de aanvrager was als volgt: "De celkweek kan de muisbioassay vervangen. In het kader van de T. gondii voedselveiligheid van vlees wordt de muisbioassay gebruikt voor: Referentietest voor de validatie van diagnostische testen (PCR, ELISA), Pathogenese en prevalentie studies om na te gaan welke dieren en welke organen van dieren geïnfecteerd zijn met T. gondii. Hierbij wordt soms eerst gebruik gemaakt van serologie of PCR, maar wordt muisbioassay gebruikt om te bepalen of de aanwezigheid van antilichamen of parasitair DNA ook betekent dat er infectieuze T. gondii aanwezig is.

Inactivatiestudies van T. gondii in vlees, zoals de studie die wij willen uitvoeren. In deze studie onderzoeken we het effect van zout, lactaat en acetaat. Echter, hier houdt het onderzoek niet mee op. Er kunnen ook andere toevoegingen (andere conserveringszouten of bijvoorbeeld specerijen en saus) en bewerkingen (drogen, roken, vriezen, verhitten, fermenteren) onderzocht worden met de muisbioassay.

Bij al deze toepassingen kan een celkweek de muisbioassay vervangen. Daarnaast is het mogelijk dat de muisbioassay op kleinere schaal wordt gebruikt omdat de celkweek al een heel aantal antwoorden geeft. In dat geval is er dus een vermindering in plaats van een complete vervanging. Bovendien is het mogelijk om met een celkweek meer variaties te onderzoeken dan met een muisbioassay kan gebeuren. Een muisbioassay is altijd beperkend in het aantal monsters. Afrondend kan gezegd worden dat er veel perspectief is voor de celkweekmethode."

5.2 lid1


Een ander DEC-lid weet niet waarom men wil testen met 3% zout als vanuit de literatuur bekend is dat 2% al voldoende is om T. gondii te doden. Ga je hier niet onnodig dieren voor inzetten en waarvoor? Wat is de noodzaak voor 2.4, 2.7 en 3%?


5.2 lid1

5.2 lid1

De DEC geeft aan dat: "Men zou verwachten dat er dan go/no go's geformuleerd zouden zijn wanneer men wel of niet gaat testen in muizen, te meer daar de onderzoeker aangeeft dat men de dierproeven zoveel mogelijk

Pagina: 16

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 22-7-2021 11:25:15
5.2 lid1

 Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-7-2021 11:28:17
5.2 lid1

wil verminderen."

In antwoord op een vraag van de DEC geeft de aanvrager aan dat "Procesmaatregelen waarvoor uit de celkweek duidelijk is dat niet alle T. gondii wordt afgedood **hoeven** niet herhaald hoeven te worden in de muisbioassay."

Een derde DEC-lid kan uit het voorstel niet opmaken of het nu om de ontwikkeling van een diermodel gaat of om een infectie-experiment. Als het doel is: de ontwikkeling van een diermodel is (een diermodel opzetten om onder experimentele omstandigheden voldoende T. gondii besmet weefsel te verkrijgen.), vraagt dit DEC-lid zich af of dat doel met de huidige opzet bereikt kan worden. Op basis van de huidige opzet, komt men in de ogen van dit DEC-lid niet tot een diermodel. **EN DUS? WAT VINDEN WIJ HIERVAN?**

Ook is dit DEC-lid van mening dat wanneer de onderzoeker schrijft dat "hartweefsel van schapen onvoldoende geschikt was omdat het aantal weefselcysten te laag was en niet homogeen verdeeld was maar ook dat van schapenharten uit het slachthuis niet bekend is of het geïnfecteerd was met T. gondii en hoe hoog de concentratie van bradyzoieten was" dit perspectief biedt. Bloed van schapen kan dan serologisch onderzocht worden en aangezien schapen vaak een paar dagen afhangen in het slachthuis zouden de positief gebleken karkassen alsnog gebruikt kunnen worden.

5.2 lid1
5.2 lid1

Dit DEC-lid vraagt zich ook af waarom gekozen is voor 20 weken oude lammeren terwijl de meeste klinische verschijnselen bij (drachtige) eersteworpsoppen wordt gezien.

5.2 lid1
5.2 lid1

Voor één van de DEC leden is het onvoldoende duidelijk waarom er nu weer een dosistitratie moet worden uitgevoerd in de muizen. Deze vraag zou nog gesteld kunnen worden aan de aanvrager.


Het is een aantal DEC-leden verder niet duidelijk of er nu wel of niet een gestandaardiseerde muisassay is en of die nu alleen voor het eigen lab is. En hoe is dan de vergelijking met andere labs?

Na een zeer snelle search op Pubmed, is in de ogen van

5.2 lid1
5.2 lid1

De DEC vraagt zich af of er volstaan kan worden met minder bloedafnames bij de schapen, aangezien het daar toch enkel gaat om het verkrijgen van positief

Pagina: 17

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 22-7-2021 11:28:52
weg


 Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 22-7-2021 11:34:56
5.2 lid1


, in DAB 1 staat:

Subdoel 2: Gebruik van een diermodel (**uit de literatuur**) om onder experimentele omstandigheden voldoende T. gondii besmet weefsel te verkrijgen.

5.2 lid1

 Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-7-2021 11:36:38
toevoegen dat de meerderheid vdan de DEC dit ook vindt

 Nummer: 4 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 22-7-2021 11:35:58
weg

 Nummer: 5 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 22-7-2021 11:36:18
onderbouwd.

vlees. 5.2 lid1
5.2 lid1

De DEC geeft aan dat bij de quizen ontbreekt of de dieren in groepen of individueel gehuisvest worden. Aangezien de aanvrager aangeeft dat volgens de eisen in de richtlijn wordt gehuisvest, gaat het Secretariaat ervan uit dat het groepshuisvesting betreft.

De schapen worden in eerste instantie bemonsterd op het bedrijf van herkomst. Dit voorkomt onnodig transport van dieren die positief blijken te zijn. 5.2 lid1

5.2 lid1

5.2 lid1

5.2 lid1

6 Voorstel besluit incl. voorstel aeldiaheidsduur van de veraunninga

5.2 lid1

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk september 2027 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.



Advies aan CCD

B

Datum 23 juli 2021

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202115002

Instelling:

5.1 lid2h

Onderzoeker:

5.1 lid2e

Project:

Verbetering voedselveiligheid door (1) ontwikkeling en validatie van de celkweek voor aantonen van levende Toxoplasma gondii parasieten in vlees als alternatief voor de muisbioassay en (2) bepalen van het effect van zout en andere toevoegingen in rauwe vleeswaren op T. gondii hiermee

Aanvraagnummer:

AVD202115002

Betreft:

Nieuwe aanvraag

Categorieën:

Translationeel of toegenast onderzoek

Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager: 1) U geeft aan dat vanuit de literatuur bekend is dat 2% zout T. gondii afdoort. Wij begrijpen dat u als een positieve controle een concentratie van 3% zout mee wilt nemen in uw dosistitratie. Het is ons echter niet volledig duidelijk waarom dan ook nog 2,1%; 2,4% en 2,7% moet worden meegenomen. Dit zal volgens recept zijn van een vleeswarenfabricant, maar het is niet duidelijk waarom 4 dose levels boven de 2% gebruikt worden, en wat dit toevoegt aan de resultaten. 2) Begrijpen wij het goed dat u in eerdere experimenten met de muis-bioassay ook dosistitratiecurves met zout heeft uitgevoerd. Kunt u aangeven waarom dit nu opnieuw nodig is? 3) Het is niet volledig duidelijk of de celkweek en de muis-bioassay gelijktijdig plaatsvinden, en of hier go/no go beslismomenten tussen kunnen worden ingevoegd. Graag dit verhelderen. 4) Het is ons niet duidelijk waarom van de geïnfecteerde schapen wekelijks een bloedmonster moet worden afgenomen, als deze dieren enkel gebruikt worden voor de 'productie' van geïnfecteerd vlees. Het lijkt er niet op dat dieren die al voldoende hoge antilichaamtiter hebben eerder zullen worden gedood. Kunt u verhelderen waarom deze meerdere bloedmonsters nodig zijn? 5) De schapen worden in eerste instantie bij het bedrijf van herkomst bemonsterd. Indien de schapen bij deze bedrijven niet volgens de
---------------	---

	EU-richtlijn 2010/63 worden gehuisvest, dan zou dit bij vraag C moeten worden benoemd.			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen				
	Schapen (<i>Ovis aries</i>)		10	Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn
3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	IFN gamma -/-	143	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Locatie niet bij instelling

3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen

Citaat: Op een regulier commercieel schapenbedrijf wordt bloed van schapen afgenomen voor screening.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen

Schapen (*Ovis aries*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Geen voorkeur voor geslacht, afhankelijk van beschikbaarheid.

3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay

Muizen (*Mus musculus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	- Niet alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. Hierboven een overzicht. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	---

2 DEC advies

DEC-advies	Citaat C4 (directe en uiteindelijke doelen): (...) De DEC heeft, bij meerderheid van stemmen, vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen de directe en uiteindelijke doelstellingen en dat de directe doelen gerechtvaardigd zijn binnen de context van het onderzoeksveld. Citaat C8 (onderzoeksopzet): Een meerderheid van de DEC is van mening dat, na beantwoording van de eerdere vragen en aanpassing van het
-------------------	---

project, het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. Enkele leden van de DEC hebben hun bedenkingen uitgesproken. Het DEC advies is dan ook geen unaniem advies. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in de ogen van de meerderheid van de DEC-leden leiden tot het behalen van de doelstelling(en) binnen het kader van het project.

Eén lid van de DEC vindt de toepasbaarheid niet duidelijk. Het celkweekstelsel kan straks worden gebruikt om de effectiviteit van andere vleesbewerkingsmethoden te onderzoeken. Het is niet duidelijk of het celkweekstelsel ook breder inzetbaar is in de praktijk: de pathogenese van *T. gondii* is al uitgebreid bestudeerd, en voor routinmatig gebruik is de celkweekmethode niet geschikt zoals de onderzoeker eerder heeft vermeld. .

Een ander DEC-lid weet niet waarom men wil testen met 3% zout als vanuit de literatuur bekend is dat 2% al voldoende is om *T. gondii* te doden. Ga je hier niet onnodig dieren voor inzetten en waarvoor? Wat is de noodzaak voor 2,4, 2,7 en 3%? In de DEC wordt vervolgens opgemerkt dat de concentraties en aantallen groepen nog niet geheel vast staan. De onderzoeker geeft daar echter geen vervolg aan. Men zou verwachten dat er dan go/no go's geformuleerd zouden zijn wanneer men wel of niet gaat testen in muizen, te meer daar de onderzoeker aangeeft dat men de dierproeven zoveel mogelijk wil verminderen.

Een derde DEC-lid kan uit het voorstel niet opmaken of het nu om de ontwikkeling van een diermodel gaat of om een infectie-experiment. Als het doel is: de ontwikkeling van een diermodel is (een diermodel opzetten om onder experimentele omstandigheden voldoende *T. gondii* besmet weefsel te verkrijgen.), vraagt dit DEC-lid zich af of dat doel met de huidige opzet bereikt kan worden. Op basis van de huidige opzet, komt men in de ogen van dit DEC-lid niet tot een diermodel.

Ook is dit DEC-lid van mening dat wanneer de onderzoeker schrijft dat "hartweefsel van schapen onvoldoende geschikt was omdat het aantal weefselcysten te laag was en niet homogeen verdeeld was maar ook dat van schapenharten uit het slachthuis niet bekend is of het geïnfecteerd was met *T. gondii* en hoe hoog de concentratie van bradyzoieten was" dit perspectief biedt. Bloed van schapen kan dan serologisch onderzocht worden en aangezien schapen vaak een paar dagen afhangen in het slachthuis zouden de positief gebleken karkassen alsnog gebruikt kunnen worden. Dit DEC-lid vraagt zich ook af waarom gekozen is voor 20 weken oude lammeren terwijl de meeste klinische verschijnselen bij (drachtige) eersteworpsooien wordt gezien.

Citaat C10 (huisvesting): De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van

richtlijn 2010/63/EU. Echter, bij de muizen ontbreekt of de dieren in groepen of individueel gehuisvest worden. Bij de schapen is niet vermeld dat de dieren in eerste instantie op het bedrijf van herkomst worden bemonsterd.

Citaat C14 (vervanging): De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Er wordt in dit projectvoorstel gepoogd om proefdiergebruik in de toekomst te vervangen door een celkweekmethode ter detectie van levende T. gondii parasieten in rauw vlees of vleesproducten.

Een van de DEC-leden merkt op dat de onderzoekers de muizenassay in het verleden al hebben gebruikt. Waarom er nu (weer?) een dosistitratie uitgevoerd moet worden in de muizen is voor dit DEC-lid onvoldoende duidelijk gemaakt .

In de vergadering is gediscussieerd dat het in het onderzoek niet om numerieke waarden zoals titer gaat maar dat men onder dezelfde omstandigheden een muisbioassay wil vergelijken met een celkweekmethode. Dan is het de vraag waarom je een dosis-titratie zou willen doen. Het is een aantal DEC-leden verder niet duidelijk of er nu wel of niet een gestandaardiseerde muisassay is en of die nu alleen voor het eigen lab is. En hoe is dan de vergelijking met andere labs?

Citaat C16 (verfijning): De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. Mede door het gebruik van HEP's kan het ongerief van de dieren zo veel mogelijk beperkt blijven tot matig. Eerder onderzoek heeft doen besluiten de controlefrequentie te intensiveren in een bepaalde periode. Hoewel niet van invloed op de cumulatieve mate van ongerief vraagt de DEC zich af of er volstaan kan worden met minder bloedafnames bij de schapen aangezien het daar toch enkel gaat om het verkrijgen van positief vlees? De DEC vindt dat dat met minder bloedafnames vastgesteld kan worden. De motivatie om wekelijks bloed af te nemen, ten behoeve van serologisch onderzoek, is niet duidelijk. Wanneer men bijvoorbeeld de duur van het experiment zou willen verkorten, door de dieren te seceren zodra een voldoende hoge antistof titer is bereikt, dan zou de DEC dat kunnen begrijpen, maar dat is in dit project geen optie. In de ogen van de DEC zou dan 1 of 2 keer bloedafname voldoende moeten zijn. Vermindering van de bloedafnamemomenten zou een verfijning kunnen opleveren.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat:

1. De centrale morele vraag van het project is: Weegt het doel, nl. het

pogen vergroten van de voedselveiligheid door beheersing van T. gondii risico's in rauwe vleeswaren door aanpassingen van procesmaatregelen (o.a. het toevoegen van zout) te onderzoeken en zo nodig te optimaliseren en de traditionele muisbioassay pogen te vervangen door een proefdiervrij alternatief, namelijk de celkweek methode, zodat procesmaatregelen voor de bereiding van vleeswaren in het laboratorium getest kunnen worden en dit niet meer hoeft in een dier, op tegen het maximaal matige ongerief (m.u.v. de dieren die dood gaan voor een HEP toegepast kan worden; die ondervinden ernstig ongerief) van maximaal 143 muizen en 10 schapen?

2. De meerderheid van de DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft in haar afweging meegewogen dat, wanneer het project zijn uiteindelijke doel haalt dit een bijdrage kan leveren het verminderen van proefdiergebruik t.b.v. toxoplasma-detectie.

De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade-baten-analyse:

- De onderzoekers hebben een reëel wetenschappelijk belang. Er is sprake van kennis vergaren. De DEC waardeert dit als een belang van beperkte morele waarde.
- De CRO heeft naast bovengenoemd reëel wetenschappelijk belang van beperkte morele waarde ook een economisch voordeel bij dit onderzoek omdat het in opdracht uitgevoerd wordt. De DEC waardeert dit als een belang van beperkte morele waarde.
- De vleeswarenssector heeft er een economisch belang bij dat zij veilige producten, (tegen een zo laag mogelijke kostprijs) kunnen verkopen aan de consument. De meerderheid van de DEC waardeert dit als een reëel belang van beperkte morele waarde.
- De maatschappij/consument heeft een reëel gezondheidsbelang bij de wetenschap dat de vleesproducten die zij eten veilig zijn. De DEC waardeert dit als een belang van reële morele waarde.
- De overheid heeft er een reëel belang bij wanneer zij door regelgeving beleid kan maken dat voedselveiligheid van vleesproducten voor de consument garandeert. De DEC waardeert dit als een belang van reële morele waarde.
- Toekomstige proefdieren kunnen voordeel hebben wanneer er een dierproefvrij alternatief voor de huidige muisbioassay ontwikkeld wordt. De DEC waardeert dit als een reëel belang van grote morele waarde.
- Tot slot zijn de waarden van de proefdieren in dit project in het geding. Zij ervaren grotendeels maximaal matig ongerief en voor ca. 10% ernstig ongerief als gevolg van de handelingen binnen het project. De integriteit van de proefdieren in dit project wordt niet sterker aangetast dan

gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef. De DEC waardeert het belang van de proefdieren als een reëel belang van grote morele waarde.

3. Op basis van bovenstaande overwegingen is de meerderheid van de DEC (7 van de 10 leden) van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar de ontwikkeling en validatie van de celkweek voor aantonen van levende *Toxoplasma gondii* parasieten in vlees als alternatief voor de muisbioassay en het bepalen van het effect van zout en andere toevoegingen in rauwe vleeswaren op *T. gondii* met maximaal matig ongerief voor maximaal 140 dieren en maximaal ernstig ongerief voor maximaal 13 muizen. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging en vermindering van het aantal dieren. De DEC ziet wel mogelijkheden op het terrein van verfijning van de aanvraag.

Twee DEC-leden twijfelen aan de haalbaarheid van de doelstelling om reden zoals onder C.8 beschreven. Eén van deze twee DEC-leden heeft ook twijfels over de te testen procesmaatregelen. Dit DEC-lid is van mening dat al bekend is dat invriezen uiterst effectief is maar nauwelijks ingezet wordt omdat dit economisch niet rendabel is. Dit DEC-lid ziet het als een ethisch probleem dat nieuwe methoden enkel om economische redenen ontwikkeld worden. Eén van deze twee DEC-leden ziet niet als doel het ontwikkelen van een dierproefvrije methode en is van mening dat het hier gaat om het uitvoeren van een infectie-experiment. Een van de DEC-leden geeft aan dat hij niet kan inschatten hoe realistisch het is dat de weefselkweek gevoeliger wordt dan de muisbioassay en om die reden niet goed tot een ethische afweging kan komen.

Voor een ander DEC-lid is het belangrijk dat er duidelijkheid komt over de te testen concentraties. Wanneer hier een bevredigend antwoord op komt kan dit DEC-lid tot een positief advies over gaan.

Samenvattend kan de centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden door 7 leden van de DEC. 3 leden van de DEC beantwoorden de centrale morele vraag op dit moment met "nee".

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

De DEC heeft vragen gesteld over o.a.:

- Waarom de celkweek, die eerder onvoldoende sensitief was, nu wel voldoende sensitief zou kunnen zijn.

- De noodzaak om schapen te infecteren met toxoplasma.

	<ul style="list-style-type: none"> - Onderbouwing waarom toevoegen van parasieten aan vlees waar het niet in zit, niet mogelijk is. - Nadere toelichting welke bredere toepassing van de T. gondii celkweekmethode in de toekomst in de praktijk kan ontstaan, en hoe deze methode/strategie proefdierbesparend is. - Onderbouwing waarom alle 16 inactivatieprocessen ook in de muizen getest moeten worden? - Effect van de toevoeging van zout, natriumacetaat of natriumlactaat effect op de celcultuur. - Verheldering waarom de detectielimiet van de muisbioassay nog moet worden bepaald. - Nadere duiding van het vervolg als de detectielimiet van de celkweekmethode hoger ligt dan die van de muis-assay. - Mogelijkheden vermindering/verfijning/go-no go. - Mogelijkheid gebruik kweekvlees - Onderbouwing range van zoutconcentraties en transleerbaarheid <p>Het DEC advies is Positief</p> <p>Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus. Drie van de tien DEC leden is van mening dat het doel van deze aanvraag niet opweegt tegen het ongerief dat de 143 muizen en 10 schapen wordt aangedaan.</p>
--	--

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>De CCD waardeert het dat u duidelijk het standpunt van de verschillende DEC leden heeft weergegeven, en welke vragen nog leven bij de DEC.</p>	

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling Doelstelling	<p>Citaat:</p> <p>Hoofddoelstellingen</p> <ol style="list-style-type: none">1. Het vergroten van de voedselveiligheid door beheersing van T. gondii risico's in rauwe vleeswaren. Dit doel wordt bereikt door het effect van huidige procesmaatregelen (o.a. het toevoegen van zout) op de bereiding van rauwe vleeswaren te bepalen en zo nodig verder te optimaliseren.2. De traditionele muisbioassay wordt vervangen door een proefdiervrij alternatief, namelijk de celkweek methode, zodat procesmaatregelen voor de bereiding van vleeswaren in het laboratorium getest kunnen worden en dit niet meer hoeft in een dier. <p>Subdoelstellingen</p> <ol style="list-style-type: none">1. Optimaliseren van de celkweek2. Een diermodel opzetten om onder experimentele omstandigheden voldoende T. gondii besmet weefsel te verkrijgen.3. Met het verkregen T. gondii vlees nagaan welke concentraties van zout en andere additieven T. gondii inactiveren en daarmee de vleeswaren veiliger maken. Deze tests worden in eerste instantie uitgevoerd met behulp van de celkweek.4. Confirmatie van de resultaten verkregen met de celkweek (subdoel 3) met de muisbioassay. <p>De muisbioassay is de 'gouden standaard'. De resultaten van afdoding van T. gondii door procesmaatregelen zal getest worden in de celkweek en vergeleken worden met de muisbioassay.</p>
-------------------------------------	---

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat:</p> <ul style="list-style-type: none"> • T. gondii wordt nationaal en internationaal erkend als een belangrijke voedselpathogeen (zie sectie 3.1). De hoge humane ziektelast maakt het noodzakelijk dat er maatregelen worden genomen om T. gondii infecties te voorkomen. • Ook wordt breed erkend dat beheersing van T. gondii risico's van rauw geconsumeerde vleesproducten gewenst is (zie ook sectie 3.1) • Voor de vleeswarenssector is het urgent en belangrijk om te weten of de huidige procesmaatregelen voor de bereiding van rauwe vleeswaren, eventueel met kleine aanpassingen van de receptuur, voldoende zijn om het risico voor de consument te beheersen. • De overheid neemt maatregelen om de veehouderij diervriendelijker en duurzamer te maken. <p>Verduurzamen van de veehouderij betekent waarschijnlijk ruimte voor het natuurlijke gedrag van koeien, varkens en kippen en zorg voor hun specifieke behoeften en daarmee wordt buitenloop gestimuleerd. Meer buitenloop van dieren betekent meer risico op een T. gondii besmetting. T. gondii oöcysten komen voor in het milieu en bijvoorbeeld in de biologische varkenshouderij hebben varkens de mogelijkheid om buiten te lopen. Juist bij deze varkens komen meer T. gondii infecties voor (Kijlstra et al., 2004).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Er is al meerdere jaren extra aandacht voor de hoeveelheid zout in voedingsmiddelen. De Gezondheidsraad beveelt aan om het gebruik in Nederland te beperken ter voorkoming of terugdringing van een hoge bloeddruk en ter vermindering van de kans op hart- en vaatziekten (Gezondheidsraad, 2015). Nederlandse vleeswarenproducenten werken aan het verder terugdringen van de zoutgehalten in hun producten. Dit project is van waarde voor de vleeswarenindustrie omdat duidelijk wordt hoeveel zout er nodig is om T. gondii in rauwe vleeswaren af te doden. De verworven kennis van dit project kan gebruikt worden om onder- of overdosering te voorkomen. • Het risico van T. gondii in rauwe vleeswaren heeft de aandacht van de Nederlandse overheid, deze heeft vragen gesteld aan de vleeswarenssector over de preventie van T. gondii risico's in rauwe vleeswaren. • De ontwikkeling van een in vitro methode als vervanging van de muisbioassay is voorwaardenscheppend voor de hoofddoelstelling, namelijk zorgen dat rauw geconsumeerde vleeswaren veiliger worden. • De evaluatie van procesmaatregelen voor beheersing van T. gondii risico's in rauw gegeten vleeswaren en eventueel het aanpassen hiervan.
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	De doelstelling is helder verwoord.

<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat uit DEC advies C7: De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, mede afgaande op het geschreven projectvoorstel en het al ervaring hebben op dit onderzoeksgebied voldoende is gewaarborgd. Verder is er een breed samenwerkingsverband met de vleeswarenssector en andere belanghebbende instellingen.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twifelen aan de kwaliteit van het onderzoek of de onderzoeksgroep.</p>
---	--

3V's

Vervanging

3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen: Citaat:

Zonder infectie van deze schapen kan het doel van het onderzoek (beheersen T. gondii voedselveiligheidsrisico's) niet bereikt worden.

1. Er is T. gondii besmet vlees nodig voor het uittesten van de verschillende procesmaatregelen en valideren van de celkweek als alternatief voor de muisbioassy. In het eerste project is geprobeerd om de procesmaatregelen uit te voeren met harten van schapen, verkregen in het slachthuis. Dit bleek echter een niet begaanbare weg omdat er onvoldoende positief materiaal werd verkregen (zie paragraaf 3.1 van het project proposal). De verwachting is dat door een experimentele infectie wel voldoende positief materiaal verkregen wordt. In een experimentele studie is de infectiegraad beter te sturen en dat maakt de kans op succes groter.

2. Een mogelijkheid om T. gondii positief vlees te verkrijgen is door het toevoegen van weefselcysten aan gemalen vlees. Echter, dit is een artificiële situatie en om de effectiviteit van de procesmaatregelen te kunnen testen is het gewenst om uit te gaan van vlees van een dier dat met T. gondii geïnfecteerd is omdat dit de werkelijkheid het beste benadert. Verder kunnen weefselcysten die in vlees aanwezig zijn mogelijk anders op de additieven reageren dan vrije weefselcysten die aan gemalen vlees worden toegevoegd. Voor het verkrijgen van weefselcysten is bovendien een dierproef nodig omdat weefselcysten alleen uit levende dieren verkregen kunnen worden.

3. Preventie van T. gondii infecties in dieren door een andere manier van dierhouderij met meer buitenloop van dieren is geen optie, buitenloop heeft eerder een averechts effect op T. gondii infecties in dieren. Vanwege de verspreiding van T. gondii in het milieu is het bijkans onmogelijk dat dieren (waaronder vooral runderen en schapen) die buiten lopen geen infectie met T. gondii oplopen. Preventie van T. gondii infecties in dieren door een strikt hygiëne regime waarbij de dieren niet meer buiten kunnen komen zou de T. gondii risico's verminderen. In de varkenshouderij in Nederland worden de meeste varkens gehouden onder gecontroleerde huisvestingscondities zonder buitenloop. Daardoor zijn de T. gondii risico's op deze bedrijven gemakkelijker te beheersen dan op schapen- en runderbedrijven waar dieren veel buiten zijn en dus geïnfecteerd kunnen raken met T. gondii. Een striktere hygiëne betekent ook dat welzijn van dieren daardoor in gedrang komt.

3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay: Citaat:
Zonder de muisbioassay kan op dit moment het doel van het onderzoek (beheersen T. gondii voedselveiligheidsrisico's van rauwe vleeswaren) niet bereikt worden:

1. De muisbioassay is de enige test waarmee levende T. gondii parasieten kunnen worden aangetoond in vlees. In dit project wordt de celkweek als alternatief voor de muisbioassay ontwikkeld en gevalideerd. Dit betekent dat de celkweek en de muisbioassay met elkaar worden vergeleken.
2. Om de muisbioassay te kunnen vervangen wordt in dit project de celkweek ontwikkeld en gevalideerd. De resultaten van de celkweek worden ook al binnen dit project gebruikt en daarmee draagt de celkweek al bij aan het verkrijgen van resultaten.

Verminderen	
	<p>3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen: Citaat:</p> <p>1. Het geïnfecteerde schapenvlees wordt gebruikt voor twee doelstellingen: 1) vervangen van de muisbioassay door een in vitro alternatief en 2) om de huidige procesmaatregelen voor de bereiding van rauwe vleeswaren te evalueren en indien nodig aan te passen. Op zich zouden beide doelstellingen in twee aparte projecten en los van elkaar uitgevoerd kunnen worden. In dit project opzet worden ze gecombineerd waardoor minder dieren nodig zijn.</p> <p>2. De eerste vraag die beantwoord zal worden in dit project is of er met een experimentele infectie van schapen voldoende T. gondii positief vlees verkregen kan worden om de procesmaatregelen te testen. Bij het eerste project werden harten van schapen uit het slachthuis gebruikt. Het bleek dat de concentratie van T. gondii parasieten in deze harten te laag was om de procesmaatregelen te testen. Dit is dus een kritisch onderdeel van het project en daarom is als subdoel 2 opgenomen of er voldoende T. gondii parasieten in het vlees aanwezig zijn en of het challenge model leidt tot het verkrijgen van voldoende T. gondii geïnfecteerd vlees. Wanneer het antwoord op deze vragen 'ja' is dan worden pas de volgende schapen geïnfecteerd met T. gondii.</p>
	<p>3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay: Citaat:</p> <p>1. In dit project wordt de celkweek ontwikkeld om de voedselveiligheid van rauwe vleeswaren te onderzoeken. Via wetenschappelijke publicaties, lezingen en workshops zullen de resultaten breder onder de aandacht gebracht worden zodat de muisbioassay niet onnodig gebruikt wordt. Dit zal bijdragen aan de reductie van muizen voor deze toepassing. Er zouden mogelijk andere alternatieven kunnen ontstaan op basis van de verkregen resultaten bijv celkweek voor andere detecties binnen het T. gondii onderzoek en die nog met muizen gebeuren.</p> <p>2. De resultaten van de celkweek worden ook al binnen het project gebruikt waardoor minder herhalingen in de muisbioassay nodig zijn.</p> <p>3. In dit project worden IFNg knockout muizen gebruikt. Deze dieren raken makkelijker geïnfecteerd, waardoor de test gevoeliger is. Met Swiss Webster zouden mogelijk meer muizen per digest nodig zijn om er zeker te zijn dat er geen levende T. gondii aanwezig is.</p>

Verfijnen	
	<p>3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen: Citaat:</p> <p>1. Bij de keuze van het aantal schapen is er op gelet om te voorkomen dat de schapen solitair worden gehuisvest. Dus dat er minimaal twee dieren bij elkaar lopen.</p> <p>2. Er zijn weinig klinische symptomen te verwachten en bij koorts worden NSAIDs gebruikt.</p>
	<p>3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay: Citaat:</p> <p>1. Muizen zijn een goede diersoort gebleken voor een T. gondii infectie. Muizen zijn gevoelig voor T. gondii infecties. In de natuur worden ze ook gemakkelijk geïnfecteerd met T. gondii en als prooi voor de katten is de parasitaire cirkel rond.</p> <p>2. Vanuit literatuur is bekend dat buprenorphine hydrochloride gemengd met het drinkwater de pijn en ongerief van een T. gondii infectie verminderen. Om die reden wordt buprenorphine hydrochloride via het drinkwater aangeboden.</p> <p>3. Humane eindpunten zijn gedefinieerd om het ongerief zoveel mogelijk te beperken. Ervaring met het uitvoeren van de muisbioassay leert dat voor 9% van de muizen het ongerief ernstig was (muizen dood gevonden). Door intensivering van de klinische monitoring (van twee naar drie keer per dag) op de HEPs is het de verwachting dat dit aantal sterk gereduceerd wordt.</p> <p>4. De procesmaatregelen waarvoor uit de celkweek blijkt dat ze weinig effect hebben op de overleving van T. gondii vervallen of worden vervangen.</p>
3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen: Voldoende beschreven.	
3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay: Voldoende beschreven.	

Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen	HEP: <1%	<p>Citaat:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Twee dagen 41°C en reageert niet op een koortsremmend middel. <p>OF</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eet en drinkt niet en is sloom. Is, ondanks eventuele toediening van medicatie, gedurende 24 uur niet in staat om zelfstandig naar de eet- of drinkbak te gaan. <p>OF</p> <ul style="list-style-type: none"> • Normale ademhalingsfrequentie voor schapen is 20 à 30 per minuut. Het HEP wordt bereikt als de ademhalingsfrequentie is drie keer zo hoog (80 à 90 per minuut) gedurende 24 uur.
Schapen (<i>Ovis aries</i>)	Ongerief: 100,0% Matig	
3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay	HEP: incidentie 69 (60+5+4) van de 102 (68%) is	<p>Citaat:</p> <ul style="list-style-type: none"> • HEPs worden toegepast als het ongerief van een individuele muis de in dit project beschreven bovengrens overschrijdt. • De muizen worden geëthanaseerd ter voorkoming van uitzichtloos of ernstig lijden. Een coderingslijst voor HEPs wordt gebruikt zoals gebruikt in het vorige project (5.1 lid2h) en voor het Toxoplasma EFSA project in 2015 en beschreven in het EFSA rapport van Opsteegh et al., 2016 (www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/995e). <p>In de bijlage dierproeven is onder vraag E een tabel toegevoegd met scores voor conditie vacht, en houding/gedrag, en maximale scores waarbij een HEP wordt bereikt.</p> <p>Citaat: Alle muizen worden één tot drie keer per dag klinisch beoordeeld afhankelijk van de fase van het experiment.</p>
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	Ongerief: 9,0% Ernstig 91,0% Matig	

5 Samenvatting

5.1 lid2e

Deze aanvraag is een vervolg op een eerdere vergunning AVD **5.1 lid2h**. De aanvrager heeft onder vraag 3.1 van het projectvoorstel duidelijk weergegeven wat de opbrengsten van dit vorige project waren, en welke vragen nog niet beantwoord zijn. **5.1 lid2h, 5.2 lid1**

Eén DEC lid heeft twijfels bij de toepasbaarheid van het project, met name gericht op de bredere inzetbaarheid van het celkweekstelsel in de praktijk. De DEC heeft hier een vraag over gesteld, het antwoord van de aanvrager was als volgt: "De celkweek kan de muisbioassay vervangen. In het kader van de T. gondii voedselveiligheid van vlees wordt de muisbioassay gebruikt voor: Referentietest voor de validatie van diagnostische testen (PCR, ELISA). Pathogenese en prevalentie studies om na te gaan welke dieren en welke organen van dieren geïnfecteerd zijn met T. gondii. Hierbij wordt soms eerst gebruik gemaakt van serologie of PCR, maar wordt muisbioassay gebruikt om te bepalen of de aanwezigheid van antilichamen of parasitair DNA ook betekent dat er infectieuze T. gondii aanwezig is.

Inactivatiestudies van T. gondii in vlees, zoals de studie die wij willen uitvoeren. In deze studie onderzoeken we het effect van zout, lactaat en acetaat. Echter, hier houdt het onderzoek niet mee op. Er kunnen ook andere toevoegingen (andere conserveringszouten of bijvoorbeeld specerijen en saus) en bewerkingen (drogen, roken, vriezen, verhitten, fermenteren) onderzocht worden met de muisbioassay.

Bij al deze toepassingen kan een celkweek de muisbioassay vervangen. Daarnaast is het mogelijk dat de muisbioassay op kleinere schaal wordt gebruikt omdat de celkweek al een heel aantal antwoorden geeft. In dat geval is er dus een vermindering in plaats van een complete vervanging. Bovendien is het mogelijk om met een celkweek meer variaties te onderzoeken dan met een muisbioassay kan gebeuren. Een muisbioassay is altijd beperkend in het aantal monsters. Afrondend kan gezegd worden dat er veel perspectief is voor de celkweekmethode."

5.2 lid1

Een ander DEC-lid weet niet waarom men wil testen met 3% zout als vanuit de literatuur bekend is dat 2% al voldoende is om T. gondii te doden. Ga je hier niet onnodig dieren voor inzetten en waarvoor? Wat is de noodzaak voor 2,4, 2,7 en 3%?

De aanvrager geeft aan dat bij het opstellen van de 16 procesmaatregelen gebruik is gemaakt van de huidige recepturen van bij het proces betrokken vleeswarenfabrikanten.

5.2 lid1

5.2 lid1

Deze vraag is daarom gesteld aan de aanvrager.

De DEC geeft aan dat: "Men zou verwachten dat er dan go/no go's geformuleerd zouden zijn wanneer men wel of niet gaat testen in muizen, te meer daar de onderzoeker aangeeft dat men de dierproeven zoveel mogelijk wil verminderen."

In antwoord op een vraag van de DEC geeft de aanvrager aan dat "Procesmaatregelen waarvoor uit de celkweek duidelijk is dat niet alle T. gondii wordt afgedood hoeven niet herhaald hoeven te worden in de muisbioassay."

Een derde DEC-lid kan uit het voorstel niet opmaken of het nu om de ontwikkeling van een diermodel gaat of om een infectie-experiment. Als het doel is: de ontwikkeling van een diermodel is (een diermodel opzetten om onder experimentele omstandigheden voldoende T. gondii besmet weefsel te verkrijgen.), vraagt dit DEC-lid zich af of dat doel met de huidige opzet bereikt kan worden. Op basis van de huidige opzet, komt men in de ogen van dit DEC-lid niet tot een diermodel. In de ogen van het Secretariaat gaat het bij de schapen in dit project om een (gestandaardiseerde) methode te ontwikkelen om besmet vlees te krijgen.

Ook is dit DEC-lid van mening dat wanneer de onderzoeker schrijft dat "hartweefsel van schapen onvoldoende geschikt was omdat het aantal weefselcysten te laag was en niet homogeen verdeeld was maar ook dat van schapenharten uit het slachthuis niet bekend is of het geïnfecteerd was met T. gondii en hoe hoog de concentratie van bradyzoieten was" dit perspectief biedt. Bloed van schapen kan dan serologisch onderzocht worden en aangezien schapen vaak een paar dagen afhangen in het slachthuis zouden de positief gebleken karkassen alsnog gebruikt kunnen worden.

5.2 lid1

Dit DEC-lid vraagt zich ook af waarom gekozen is voor 20 weken oude lammeren terwijl de meeste klinische verschijnselen bij (drachtige) eersteworpsooien wordt gezien.

5.2 lid1

Voor één van de DEC leden is het onvoldoende duidelijk waarom er nu weer een dosistitratie moet worden uitgevoerd in de muizen. Deze vraag is gesteld aan de aanvrager.

Het is een aantal DEC-leden verder niet duidelijk of er nu wel of niet een gestandaardiseerde muisassay is en of die nu alleen voor het eigen lab is. En hoe is dan de vergelijking met andere labs?

De aanvrager geeft aan dat de muisbioassay een internationaal aanvaarde gouden standaard is voor het bepalen van de aanwezigheid van levend T. gondii.

De DEC vraagt zich af of er volstaan kan worden met minder bloedafnames bij de schapen, aangezien het daar toch enkel gaat om het verkrijgen van positief vlees. 5.2 lid1

De DEC geeft aan dat bij de muizen ontbreekt of de dieren in groepen of individueel gehuisvest worden. Aangezien de aanvrager aangeeft dat volgens de eisen in de richtlijn wordt gehuisvest, gaat het Secretariaat ervan uit dat het groepshuisvesting betreft.

De schapen worden in eerste instantie bemonsterd op het bedrijf van herkomst. Dit voorkomt onnodig transport van dieren die positief blijken te zijn. 5.2 lid1

5.2 lid1

5.2 lid1

5.2 lid1

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

5.2 lid1

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk september 2027 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: vrijdag 23 juli 2021 17:20
Aan: 5.1 lid2h
CC: 5.1 lid2e 5.1 lid2h
Onderwerp: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202115002

Categorieën: Dossier: 5.1 lid2e

Geachte 5.1 lid2e,

Op 10-06-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Verbetering voedselveiligheid door (1) ontwikkeling en validatie van de celkweek voor aantonen van levende Toxoplasma gondii parasieten in vlees als alternatief voor de muisbioassay en (2) bepalen van het effect van zout en andere toevoegingen in rauwe vleeswaren op T. gondii hiermee" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202115002. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Onduidelijkheden

- 1) U geeft aan dat vanuit de literatuur bekend is dat 2% zout T. gondii afdoodt. Wij begrijpen dat u als een positieve controle een concentratie van 3% zout mee wilt nemen in uw dosistitratie. Het is ons echter niet volledig duidelijk waarom dan ook nog 2,1%; 2,4% en 2,7% moet worden meegenomen. Dit zal volgens recept zijn van een vleeswarenfabricant, maar het is niet duidelijk waarom 4 dose levels boven de 2% gebruikt worden, en wat dit toevoegt aan de resultaten.
- 2) Begrijpen wij het goed dat u in eerdere experimenten met de muis-bioassay ook dosistitratiecurves met zout heeft uitgevoerd. Kunt u aangeven waarom dit nu opnieuw nodig is?
- 3) Het is niet volledig duidelijk of de celkweek en de muis-bioassay gelijktijdig plaatsvinden, en of hier go/no go beslismomenten tussen kunnen worden ingevoegd. Graag dit verhelderen.
- 4) Het is ons niet duidelijk waarom van de geïnfecteerde schapen wekelijks een bloedmonster moet worden afgenomen, als deze dieren enkel gebruikt worden voor de 'productie' van geïnfecteerd vlees. Het lijkt er niet op dat dieren die al voldoende hoge antilichaamtiter hebben eerder zullen worden gedood. Kunt u verhelderen waarom deze meerdere bloedmonsters nodig zijn?
- 5) De schapen worden in eerste instantie bij het bedrijf van herkomst bemonsterd. Indien de schapen bij deze bedrijven niet volgens de EU-richtlijn 2010/63 worden gehuisvest, dan zou dit bij vraag C moeten worden benoemd.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via

NetFTP.

Ter informatie: Uw aanvraag wordt besproken in de CCD vergadering van 30 juli 2021. U heeft in principe 14 dagen de tijd om de vragen te beantwoorden. Als uw reactie uiterlijk 29 juli bij ons ontvangen is, kunnen wij deze informatie mondeling inbrengen in de vergadering.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

5.1 lid2h

Aan de Centrale Commissie Dierproeven
T.a.v. 5.1 lid2e
Beantwoording vragen AVD 5.1 lid2h 202115002

Geachte leden van de CCD,

Op 10 juni 2021 heeft u onze aanvraag AVD 5.1 lid2e, 5.1 lid2 202115002 ontvangen en op 23 juli 2021 heeft u onze aanvraag besproken en per email een aantal vragen gestuurd. We danken u voor uw vragen. In de bijlage hebben we gepoogd deze zo goed mogelijk te beantwoorden. Waar mogelijk, hebben we de antwoorden verwerkt in APandE. Bij de antwoorden op de vragen hebben we aangegeven waar en hoe APandE is aangepast en in APandE zijn de gewijzigde teksten in het groen weergegeven.

We hopen van harte dat deze beantwoording de CCD voldoende duidelijkheid biedt om een besluit te nemen.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

Namens het project team

5.1 lid2h

DATUM
19 augustus 2021

POSTADRES
5.1 lid2h

BEZOEKADRES
5.1 lid2h

INTERNET
5.1 lid2h

K/VK NUMMER
5.1 lid2h

CONTACTPERSOON
5.1 lid2e

TELEFOON
5.1 lid2e

E-MAIL
5.1 lid2e

5.1 lid2h

Bijlage: Beantwoording vragen CCD AVD 5.1 lid2h 202115002

1) U geeft aan dat vanuit de literatuur bekend is dat 2% zout *T. gondii* afdoemt. Wij begrijpen dat u als een positieve controle een concentratie van 3% zout mee wilt nemen in uw dosistitratie. Het is ons echter niet volledig duidelijk waarom dan ook nog 2,1%; 2,4% en 2,7% moet worden meegenomen. Dit zal volgens recept zijn van een vleeswarenfabricant, maar het is niet duidelijk waarom 4 dose levels boven de 2% gebruikt worden, en wat dit toevoegt aan de resultaten.

Antwoord:

Dat 2% NaCl *T. gondii* afdoemt lijkt op basis van de aanvraag een gegeven, maar daar is enige nuance op z'n plaats. Die 2% is met name gebaseerd op twee artikelen (Hill et al., 2006; Hill et al., 2004), maar er is ook literatuur waarin 2% nog niet volledig effectief blijkt (Dubey, 1997; Neumayerová et al., 2014; Pott et al., 2013). In onze eigen experimenten uit het voorgaande project (AVD 5.1 lid2h) zagen we bij de hoogste NaCl concentratie (1.6% NaCl i.c.m. lactaat en acetaat; methode III) nog geen volledige inactivatie (Opsteegh et al., 2020). We verwachten dus dat er in de range van 2 tot 3% NaCl nog wel verschillen in effectiviteit zijn. Om het effect van zout op de overleving van *Toxoplasma* te kunnen modelleren (een dosis-respons model), en zo op basis van onze resultaten ook de effectiviteit van tussenliggende concentraties te kunnen voorspellen, is een range aan concentraties nodig waarbij de hoogste concentratie in ieder geval volledig effectief is. Op die manier zijn we op de reeks van 0,6% tot 2,7% NaCl uitgekomen. Deze range is in de praktijk relevant omdat ook 2,5% NaCl in filet americain recepten wordt gebruikt.

In het projectproposaal hebben we de tekst over 2% zout aangepast zoals hierboven omschreven.

2) Begrijpen wij het goed dat u in eerdere experimenten met de muis-bioassay ook dosistitratiecurves met zout heeft uitgevoerd. Kunt u aangeven waarom dit nu opnieuw nodig is?

Antwoord:

In de eerdere experimenten zijn geen dosistitratiecurves met zout uitgevoerd. In dat project zijn enkele relevante recepten uitgevoerd met zout in combinatie met andere toevoegingen (zie onderstaande tabel 2 uit (Opsteegh et al., 2020)). Met slechts 5 uiteenlopende recepten zijn er onvoldoende gegevens om het effect van zout te modelleren. Zoals bij voorgaande vraag ook vermeld, kiezen wij in dit project voor een reeks van concentraties zodat door te modelleren ook voor tussenliggende concentraties (variëaties op de recepten) het effect worden geschat.

Table 2

Final concentrations of sodium lactate, sodium acetate and sodium chloride in samples for processing methods I-V.

Processing method	% Na lactate (dry matter)	% Na acetate	% NaCl
Method I	1.19	0.26	1.20
Method II	0.61	0.29	0.15
Method III	1.08	0.32	1.60
Method IV	1.40	0	0
Method V	1.00	0	1.00

3) Het is niet volledig duidelijk of de celweek en de muis-bioassay gelijktijdig plaatsvinden, en of hier go/no go beslismomenten tussen kunnen worden ingevoegd. Graag dit verhelderen.

Antwoord:

Bij subdoel 3 worden de procesmaatregelen alleen in de celkweek getest en is deze vraag niet aan de orde. Bij subdoel 4 vinden celkweek en muisbioassay tegelijk plaats. Hier worden de celkweekresultaten uit subdoel 3 gevalideerd door herhaling en vergelijking met muisbioassay en wordt de detectielimiet van beide methoden vergeleken. Procesmaatregelen worden per portie geïnfecteerd vlees uitgevoerd en vervolgens wordt hetzelfde digest vers ingespoten in een muis en op de cellen gebracht. Het is belangrijk het digest vers (binnen drie dagen) te gebruiken en dus niet mogelijk eerst de celkweek uit te voeren en vervolgens pas als de resultaten na minimaal 3 weken beschikbaar zijn te besluiten of het digest in een muis ingespoten wordt. Er is dus geen mogelijkheid voor een go/no-go moment binnen subdoel 4.

4) Het is ons niet duidelijk waarom van de geïnfecteerde schapen wekelijks een bloedmonster moet worden afgenomen, als deze dieren enkel gebruikt worden voor de 'productie' van geïnfecteerd vlees. Het lijkt er niet op dat dieren die al voldoende hoge antilichaamtiter hebben eerder zullen worden gedood. Kunt u verhelderen waarom deze meerdere bloedmonsters nodig zijn?

Antwoord:

Aanvankelijk was ons doel om de serologische reactie op de infectie intensief (wekelijks) te volgen. Het doel van de wekelijkse afnames was om een antilichaamtitercurve te maken om het verloop van de infectie per dier gedetailleerd in beeld brengen. Door u terechtte vraag hebben wij de afweging opnieuw gemaakt of het aantal bloedafnames verlaagd kan worden om zo het ongerief voor de dieren verder te beperken. We hebben besloten het schema aan te passen en de bloedmonsters uitsluitend op kritische momenten af te nemen. Het schema is als volgt aangepast:

Week -3 en dag 0: vaststellen (-3) en bevestiging (0) van de T. gondii negatieve status.

Week 2: eerste effect van experimentele infectie

Week 6: verwachting dat schapen serologisch positief zijn

Week 9: bevestiging van positieve status kort voordat euthanasie plaatsvindt.

Het aantal bloedafnames per schaap is met vijf verminderd van 10 naar 5 (voor de eerste twee schapen) en van 13 naar 8 voor overige drie schapen.

In de animal procedure in hebben we figuur 2 en 3 aangepast. Verder is de tekst over de bloedafname ook gewijzigd.

5) De schapen worden in eerste instantie bij het bedrijf van herkomst bemonsterd. Indien de schapen bij deze bedrijven niet volgens de EU-richtlijn 2010/63 worden gehuisvest, dan zou dit bij vraag C moeten worden benoemd.

Antwoord:

De volgende tekst is toegevoegd aan de sectie C: Het eerste bloedmonster van de schapen zal worden verkregen op een regulier commercieel schapenbedrijf waar de dieren voor dit onderzoek worden verkregen. De huisvesting zal op dat moment in overeenstemming zijn met de richtlijnen van de commerciële landbouw. De huisvesting van de geselecteerde dieren zal na transport naar onze onderzoeksinstelling wel volgens EU-richtlijn 2010/63 zijn.

Het antwoord van vraag C is aangepast naar "no".

Dubey, J.P., 1997. Survival of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in 0.85-6% NaCl solutions at 4-20 C. *J Parasitol* 83, 946-949.

Hill, D.E., Benedetto, S.M., Coss, C., McCrary, J.L., Fournet, V.M., Dubey, J.P., 2006. Effects of time and temperature on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in enhanced pork loin. *J Food Prot* 69, 1961-1965.

- Hill, D.E., Sreekumar, C., Gamble, H.R., Dubey, J.P., 2004. Effect of commonly used enhancement solutions on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork loin. *J Food Prot* 67, 2230-2233.
- Neumayerová, H., Juránková, J., Saláková, A., Gallas, L., Kovařík, K., Koudela, B., 2014. Survival of experimentally induced *Toxoplasma gondii* tissue cysts in vacuum packed goat meat and dry fermented goat meat sausages. *Food Microbiology* 39, 47-52.
- Opsteegh, M., Dam-Deisz, C., de Boer, P., DeCraeye, S., Fare, A., Hengeveld, P., Luiten, R., Schares, G., van Solt-Smits, C., Verhaegen, B., Verkleij, T., van der Giessen, J., Wisselink, H.J., 2020. Methods to assess the effect of meat processing on viability of *Toxoplasma gondii*: towards replacement of mouse bioassay by in vitro testing. *Int J Parasitol* 50, 357-369.
- Pott, S., Koethe, M., Bangoura, B., Zoller, B., Dauschies, A., Straubinger, R.K., Fehlhaber, K., Ludewig, M., 2013. Effects of pH, sodium chloride, and curing salt on the infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *J Food Prot* 76, 1056-1061.



Centrale Commissie Dierproeven

Form

Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- | | | |
|-----|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 5.1 lid2h |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | 5.1 lid2h |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Verbetering voedselveiligheid door (1) ontwikkeling en validatie van de celkweek voor aantonen van levende Toxoplasma gondii parasieten in vlees als alternatief voor de muisbioassay en (2) bepalen van het effect van zout en andere toevoegingen in rauwe vleeswaren op T. gondii hiermee |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|--|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input type="checkbox"/> Basic Research |
| | | <input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research |
| | | <input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production |
| | | <input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare |
| | | <input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures |
| | | <input type="checkbox"/> Higher education or training |
| | | <input type="checkbox"/> Forensic enquiries |
| | | <input type="checkbox"/> Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures |

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.1.

Introductie

Dit project betreft onderzoek naar voedselveiligheid met betrekking tot de parasiet *Toxoplasma gondii*. Mensen kunnen geïnfecteerd worden met *T. gondii* door het eten van rauw of onvoldoende verhit vlees en dit project beoogt de risico's hiervan te verminderen.

Om de context van het projectvoorstel te duiden wordt in dit eerste deel algemene informatie gegeven over vleesconsumptie en vleesproductie. Verder wordt ook informatie gegeven over voedselveiligheidsrisico's in het algemeen en de beheersing van deze risico's.

Gezond en veilig vlees

De relatie tussen vleesconsumptie en een gezond en duurzaam voedingspatroon is een prominent onderwerp in het maatschappelijke debat. Er is onderzoek naar de invloed van vlees eten op gezondheid, duurzaamheid en klimaat. Ook worden er cijfers verzameld over vleesconsumptie, wordt er gekeken naar consumentengedrag en -voorkeuren en wordt onderzoek gedaan naar vleesvervangers en alternatieve eiwitbronnen.

Wanneer een consument vleeswaren (bewerkte producten van vlees) eet dienen deze veilig te zijn. Deze voedselveiligheid is de focus van dit voorstel en het betreft met name de voedselveiligheid gerelateerd aan de parasiet *T. gondii*, één van de ziekteverwekkers die door vlees wordt overgedragen op de mens.

Vleesconsumptie in Nederland

De gemiddelde Nederlander eet ruim 38 kilo vlees per jaar, ongeveer 11 kg daarvan wordt gegeten als vleeswaren. In de periode 2010 – 2015 was er sprake van een lichte daling van de vleesconsumptie, maar sinds 2018 is er weer een lichte stijging. Ongeveer de helft van de Nederlanders noemt zichzelf 'flexitariër'. Dat wil zeggen dat ze minimaal drie keer per week geen vlees bij de warme maaltijd eten. Het aandeel vegetariërs ligt stabiel op iets minder dan vijf procent van de Nederlandse bevolking **5.1 lid2h**.

Deng et al., 2020 maakte op basis van gegevens van de Nederlandse Nationale Voedselconsumptiepeiling 2007–2010 een lijst van 83 van de meest gegeten producten van vlees. Deze lijst omvat 36 producten afkomstig van varkensvlees, 27 van rundvlees, 8 van kalfsvlees, 7 van lamsvlees, 2 van rundvlees / varkensvlees gemengd en 2 van schapenvlees. Verreweg de meeste producten van vlees op deze lijst worden verhit tijdens de bereiding. De lijst bevat 18 vleesproducten die niet verhit worden tijdens de productie en direct gegeten worden. Dit betreft 3 rundvlees, 13 varkensvlees en 2 rundvlees/varkensvlees gemengde producten van vlees waaronder bijvoorbeeld droge worsten, ham en filet americain (zie lijst in Deng et al., 2020).

Toelichting rauw gegeten vlees: dit vlees wordt in tegenstelling tot vers vlees bewerkt en worden er zout en andere additieven zoals natriumacetaat en natriumlactaat aan toegevoegd.

Vleesproductie in Nederland

Naast de voorziening voor eigen consumptie produceert Nederland jaarlijks veel vlees voor andere landen. Dit vlees wordt geëxporteerd naar meer dan 140 landen over de hele wereld. Verspreid over al die landen eten ruim 100 miljoen mensen vlees en vleeswaren die uit Nederland komen (Centrale Organisatie voor de Vleessector – COV; www.cov.nl).

Voedselveiligheidsrisico's (van voedsel en van vlees)

Het RIVM onderzoekt elk jaar de Nederlandse consumptie en bepaalt hoeveel mensen ziek worden of sterven aan 14 voedsel-gerelateerde ziekteverwekkers die via voedsel worden overgedragen: *Campylobacter* spp., STEC O157, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* toxine, *Clostridium perfringens* toxine, *Staphylococcus aureus* toxine, Norovirus, Rotavirus, Hepatitis A virus, Hepatitis E virus, *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *Toxoplasma gondii*. De 14 ziekteverwekkers kunnen niet alleen via voedsel in het lichaam van de mens terechtkomen. Het kan

ook via het milieu (bijvoorbeeld via oppervlaktewater), dieren, en van mens op mens. Het aandeel van deze routes verschilt per ziekteverwekker.

De ziektelast wordt uitgedrukt in DALY's (Disability Adjusted Life Year), een internationale maat voor het aantal gezonde levensjaren dat verloren gaat aan ziekte of voortijdig overlijden. Het totaal aantal DALY's die deze 14 ziekteverwekkers in 2019 veroorzaakten is 11.000 DALY's, dus 11.000 verloren levensjaren. Iets meer dan 1700 DALY's (15%) werd in verband gebracht met vlees (d.w.z. gevogelte, varkensvlees, rundvlees en lamsvlees) (Lagerweij et al., 2020).

Beheersen van voedselveiligheidsrisico's

Om de voedselveiligheid te vergroten wordt er veel aandacht besteed aan het veilig produceren van voedsel (inclusief vlees).

- De rijksoverheid heeft wetgeving opgesteld waar producenten van voedingsmiddelen aan moeten voldoen. Zo worden in de 'Wet dieren' eisen aan de microbiologische veiligheid van vlees en andere dierlijke producten gesteld en wordt in de 'Warenwet' van voedingsmiddelenbedrijven geëist dat deze moeten zorgen voor de veiligheid van voedsel; consumenten mogen er niet ziek van worden.
- Namens de overheid houdt de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA) hier toezicht op.
- Niet alleen de rijksoverheid stelt voorwaarden en houdt toezicht. Ook de sector zelf levert hier een bijdrage aan, zowel bij de primaire productie als bij de verwerking werkt ze aan bewustwording van producenten van voedselveiligheidsrisico's en stelt normen vast voor een veilige productie.
- Tot slot is ook voorlichting van de consument over mogelijke voedselveiligheidsrisico's van belang evenals voorlichting over de veilige bereiding van voedingsmiddelen.

Toxoplasma gondii

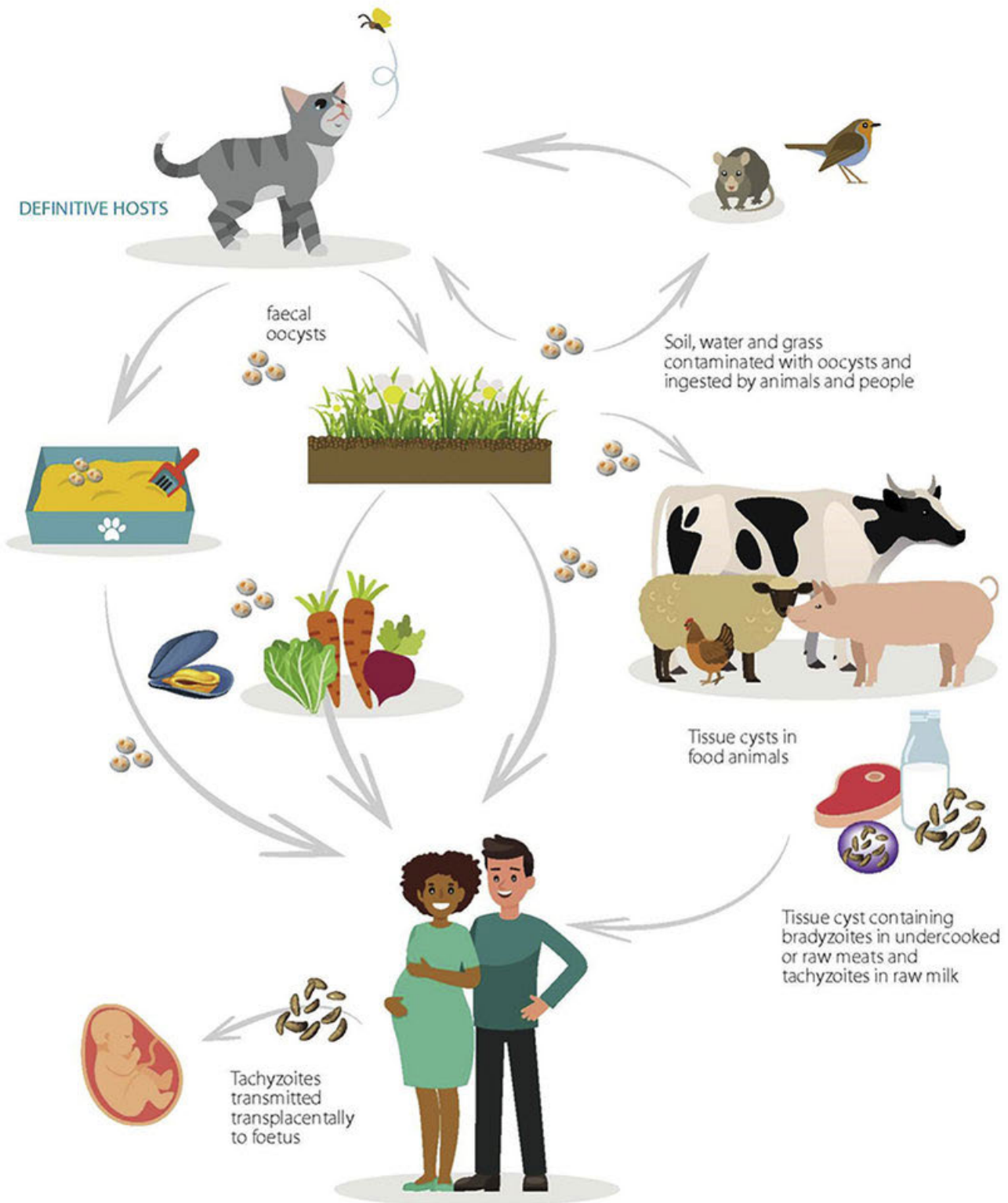
T. gondii is één van de meest voorkomende zoönotische parasieten ter wereld en vrijwel alle warmbloedige dieren, inclusief mensen, zoogdieren en vogels kunnen besmet worden door deze ziekteverwekker. *T. gondii* is de veroorzaker van toxoplasmose, een potentieel ernstige ziekte bij de mens die leidt tot een hoge humane ziektelast. Naar schatting is ongeveer een derde van de wereldbevolking geïnfecteerd met de parasiet (Tenter et al., 2000). Zwangere vrouwen en mensen met een verminderde immuniteit vormen de belangrijkste risicogroepen. Ook gezonde mensen kunnen geïnfecteerd worden, waarbij tijdelijke algemene ziekteverschijnselen als lymfklierzwellingen en koorts kunnen voorkomen en terugkerende ontstekingen in het oog (chorioretinitis) tot ernstige gezichtsstoornissen kunnen leiden.

Levenscyclus *T. gondii* (zie figuur 1)

T. gondii heeft een complexe levenscyclus met verschillende infectieuze stadia en meerdere gastheren. Er zijn drie infectieuze stadia van *T. gondii*: 1. tachyzoïeten in de bloedbaan, 2. bradyzoïeten in weefselcysten en 3. sporozoïeten in oöcysten (Dubey, 1998). De kat is de enige eindgastheer van de parasiet en de kat heeft daarom de belangrijkste rol bij de overdracht van *T. gondii*. Katten kunnen zichzelf infecteren door opname van één van de drie infectieuze stadia van *T. gondii* (Dubey, 2010). Vervolgens kunnen ze miljoenen oöcysten via de ontlasting uitscheiden in het milieu (Dubey et al., 2010). Uitscheiding van oöcysten kan tot ongeveer 20 dagen aanhouden (Dubey, 2010). Oöcysten sporuleren binnen enkele dagen in het milieu en kunnen gedurende meer dan een jaar infectieus blijven in de bodem of het water. Een breed scala aan warmbloedige dieren kan geïnfecteerd raken door opname van gesporuleerde oöcysten uit besmette omgeving en kunnen dus dienen als tussengastheer van de parasiet (Dubey, 1998). Na opname van oöcysten door een tussengastheer (bijv mens of dier) worden sporozoïeten vrijgemaakt in de darm van deze tussengastheer. De sporozoïeten dringen de darmcellen in en worden daar omgezet in tachyzoïeten. Tachyzoïeten worden snel via de bloedstroom naar alle weefsels verspreid. In de weefsels worden weefselcysten gevormd met daarin tot wel 3000 bradyzoïeten per weefselcyste. Weefselcysten kunnen zich 7-10 dagen na infectie vormen en blijven leven in meerdere organen, het spierweefsel en de spieren van het centrale zenuwstelsel. Aangenomen wordt dat weefselcysten levensvatbaar blijven gedurende het leven van de gastheer. Als de kat een geïnfecteerde tussengastheer opneemt (bijvoorbeeld knaagdieren of vogels), is de cyclus van *T. gondii* voltooid. In tegenstelling tot de kat als eindgastheer scheiden tussengastheren *T. gondii* niet uit via de ontlasting, maar dierlijke

tussengastheren kunnen de infectie wel overdragen aan de mens door het eten van het vlees van die dieren.

FOODBORNE TRANSMISSION PATHWAYS FOR *TOXOPLASMA GONDII*



LEGEND

- 
Oocysts
- 
Tachyzoites
- 
Bradyzoite

Figur 1: levenscyclus *Toxoplasma gondii*

Infectie routes - Milieu en vlees

Er zijn twee routes waarlangs *T. gondii* mensen kan infecteren. Dat is via het milieu, door bijvoorbeeld tuinieren of door het eten van rauwe groenten, besmet met oöcysten afkomstig uit de ontlasting van de kat. De andere route is via vlees, door het eten van rauw of onvoldoende verhit vlees of vleesproducten van geïnfecteerde dieren, besmet met weefselcysten. In Nederland wordt geschat dat 56% van de *T. gondii* infecties in de mens is toe te schrijven aan voedsel (o.a. vlees) en 36% aan contact met oöcysten in het milieu (o.a. water en grond) (Havelaar et al., 2008). Dit projectvoorstel is van toepassing op de risico's op *T. gondii* infecties in de mens via de vleesroute met als doel de voedselveiligheid te verbeteren.

Humane ziektelast van *T. gondii*

T. gondii wordt nationaal en internationaal erkend als een belangrijke voedselpathogeen, de humane ziektelast is hoog. Dit blijkt uit de resultaten van de volgende studies:

- Als tijdens de zwangerschap een infectie van de moeder met *T. gondii* optreedt, dan kunnen de tachyzoïeten de placenta passeren en het ongeborn kind infecteren. Dit leidt tot aangeboren toxoplasmose (Dunn et al., 1999). Het grootste deel van de ziektelast die gepaard gaat met infectie met *T. gondii* bij de mens is te wijten aan aangeboren toxoplasmose. In 2013 werd de jaarlijkse wereldwijde incidentie van aangeboren toxoplasmose geschat op 190.100 gevallen (1,5 per 1000 levendgeborenen), en de last van aangeboren toxoplasmose werd geschat op 1,2 miljoen DALY's (Torgerson en Mastroiacovo, 2013).
- In 2015 stond *T. gondii* op de vierde plaats van 24 door voedsel overgedragen parasieten wereldwijd (WHO, 2015).
- In de jaarlijkse vergelijking van de ziektelast van 14 voedseloverdraagbare ziekteverwekkers staat de ziektelast door congenitale en oog (oculaire) toxoplasmose in Nederland op de tweede plaats na *Campylobacter* (Lagerweij et al., 2020).
- In Europa, stond *T. gondii* op de tweede plaats van een ranglijst van 23 door voedsel overgedragen parasieten waarin rekening werd gehouden met de volksgezondheid, de handel en het sociaal economische belang (Bouwknegt et al., 2018).

Huidige strategieën voor preventie *T. gondii* risico's

Bovenstaande lijst geeft de impact van *T. gondii* op zowel nationale als internationale schaal duidelijk weer, daarom zijn in Nederland de volgende preventie strategieën van toepassing:

- Voorlichting van de risicogroepen (zwangere vrouwen en mensen met verminderde weerstand) wordt als belangrijk gezien. Bij deze voorlichting gaat het niet alleen om het vermijden van rauwe (rund)vleesproducten, maar ook om bijvoorbeeld hygiënemaatregelen bij het tuinieren. Verder geldt voor de algemene bevolking het advies vlees goed te verhitten.
- Voor (vlees)producten die doorgaans rauw gegeten worden zoals filet americain, geldt in het algemeen dat invriezen van het vlees waarmee de producten worden gemaakt een goede methode is om *T. gondii* te doden. Invriezen kent echter ook beperkingen. Het is in veel gevallen niet wenselijk vanwege overmatig vochtverlies, invriezen heeft een negatief effect op de kwaliteit (verkleuring) en levert bezwaren op bij afnemers (structuurverlies en hogere kosten). Verder kosten faciliteiten voor invriezen en ontdooien geld en energie. Bovendien zijn er voedselveiligheidsrisico's verbonden aan ontdooien van vlees. Wanneer het vlees niet gelijkmatig (alleen aan de buitenkant en niet in de kern) ontdooid dan kunnen er ongewenste bacteriën groeien in het vlees.
- De NVWA houdt bij producenten toezicht op de aanwezigheid van een voedselveiligheidsplan en controleert specifiek of *T. gondii* daarin is opgenomen als relevant gevaar.
- Andere preventieve benaderingen zijn het vergroten van de bioveiligheid bij het produceren van vlees. Maatregelen als bestrijding van knaagdieren, katten uit de buurt houden van boerderij / strooisel / opslag en zorgen voor schoon drinkwater op varkensbedrijven worden over het algemeen genomen voor dieren die binnen worden gehouden, maar deze maatregelen zijn onvoldoende voor dieren met buitenuitloop omdat *T. gondii* in het milieu voorkomt.
- Voor schapen is er een vaccin, dit wordt gebruikt om abortus als gevolg van *T. gondii* te voorkomen. Voor de overige landbouwhuisdieren is er geen vaccin.
- Er is geen commercieel verkrijgbaar vaccin voor gebruik bij katten en mensen. Bovendien, gebaseerd op wiskundige modellen is een hoge vaccinatiegraad voor katten nodig om het aantal menselijke infecties te verminderen. Een hoge dekking wordt als onhaalbaar beschouwd voor grote kattenpopulaties (Bonačić Marinović et al., 2019).

Samenvattend kan gezegd worden dat strategieën zijn ontwikkeld voor beheersing van *T. gondii* voedselveiligheidsrisico's. Echter, dit is nog niet effectief genoeg want de humane ziektelast voor *T.*

gondii is nog steeds hoog in Nederland en daarbuiten. Dit vraagt om een uitbreiding van de huidige preventieve maatregelen.

T. gondii risico's van rauwe vleeswaren

Uit onderzoek blijkt dat T. gondii voedselveiligheidsrisico's verbonden zijn aan het eten van vlees en met name van rauw gegeten vleeswaren.

- Uit een studie onder zwangere vrouwen in Europa bleek dat tussen 30% en 63% van de infecties konden worden toegeschreven aan consumptie van rauw of onvoldoende verhit vlees en vleesproducten (Cook et al., 2000).
 - Om het relatieve belang van de verschillende rauwe vleesproducten in kaart te brengen heeft het RIVM een QMRA-model (kwantitatieve microbiologische risicobeoordeling) ontwikkeld (Opsteegh et al. 2011). In dit model wordt op basis van het vóórkomen van T. gondii infectie bij de verschillende diersoorten, de afdoding door bereiding en de consumptiegegevens, voor ieder vleesproduct het aantal humane infecties voorspeld. Uit dit model blijkt dat 41% van de voorspelde infecties is toe te schrijven aan onverhitte vleesproducten (cervelaat, salami, filet américain, runderrookvlees, Suçuk droge Turkse worst, bacon, ontbijtspek, rauwe ham en theeworst). Doordat er slechts beperkt gegevens beschikbaar waren over de afdoding van T. gondii bij de bereiding van de vleesproducten zijn om die reden alleen de processtappen vriezen, verhitten en zouten opgenomen in het model. Het is zeer waarschijnlijk dat methodes als roken, zuren, fermenteren en het gebruik van andere additieven ook effect heeft op de levensvatbaarheid van T. gondii, en dus is het aantal voorspelde infecties voor bepaalde producten waarschijnlijk overschat.
 - In 2020 werd het QMRA model aangepast en opnieuw werd het relatieve belang uitgerekend (Deng et al., 2020). Resultaten tonen aan dat rundvlees de belangrijkste bron blijft, aangezien het 84% bijdroeg aan het totale aantal voorspelde besmettingen onder de Nederlandse bevolking, gevolgd door varkensvlees (12%), schapenvlees (3,7%), lamsvlees (0,2%) gemengd varkensvlees / rundvlees producten (0,1%) en kalfsvlees (0,01%). Op productniveau droeg alleen filet américain bij aan 80% van de totale voorspelde infecties in het basismodel, maar scenario analyses tonen aan dat de bijdrage ervan sterk afhankelijk is van de hoeveelheid zout die gebruikt wordt bij de bereiding van rauwe vleeswaren. Om die reden is het belangrijk dat de effecten van zouten en andere toevoegingen aan rauwe vleeswaren worden geëvalueerd.
- Samenvattend kan gezegd worden dat er T. gondii voedselveiligheidsrisico's zijn verbonden aan het eten van rauwe vleeswaren. Nader onderzoek is nodig naar de veiligheid van deze producten en met name is er antwoord nodig op de vraag of T. gondii afgedood in rauwe vleeswaren tijdens de bereiding of dat er een aanpassing van de receptuur nodig is.

Huidige mogelijkheden voor detectie van T. gondii parasieten

Voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag naar afdoding van T. gondii in rauwe vleeswaren tijdens de bereiding hiervan is een detectiemethode nodig. Deze methode moet in staat zijn om levende T. gondii parasieten aan te tonen. De meeste diagnostische testen (zoals serologie en PCR) maken geen verschil tussen dode en levende T. gondii parasieten. De bioassay in muizen is de enige methode waarmee dit wel kan. Hieronder wordt dit verder toegelicht.

- Detectie van T. gondii infecties met PCR: Voor diagnostiek van T. gondii infecties wordt een qPCR techniek gebruikt om het genetisch materiaal van de parasiet aan te tonen. De gevoeligheid van deze qPCR is soms te laag om weefselcysten aan te tonen in geïnfecteerde dieren. De reden hiervoor is dat het aantal weefselcysten laag kan zijn in geïnfecteerde dieren en daarom zijn er methodes ontworpen om een grotere hoeveelheid vleesmonster te testen, zodat de kans om een weefselcyste te vinden groter wordt. De magnetic-capture qPCR (MC-qPCR) is daar een voorbeeld van, hiermee kan één weefselcyste in 100 gram vlees worden aangetoond.
- Detectie van T. gondii infecties met serologie: Voor diagnostiek worden ook serologische testen gebruikt waarmee de antilichaamrespons tegen T. gondii (en niet de parasiet zelf) wordt aangetoond bij het dier. Uit onderzoek van Opsteegh et al., (2016) bleek dat voor varkens, kleine herkauwers en kippen serologie kan helpen om het risico voor de consument te bepalen, maar serologie is minder van waarde voor andere diersoorten zoals paarden en rundvee.
- Detectie van levende T. gondii met de muis bioassay: Met de PCR wordt T. gondii DNA aangetoond. Dit geeft echter geen indicatie over de aanwezigheid van levende T. gondii, er wordt slechts de aanwezigheid van genetisch materiaal van T. gondii aangetoond. Voor diagnostiek van T. gondii infecties is in het algemeen de PCR vaak voldoende. Echter, voor sommige vraagstellingen kan het van belang zijn om wél onderscheid te maken tussen levende en dode T. gondii. Bijvoorbeeld in studies (zoals deze) om het effect van zout op de levensvatbaarheid van T. gondii te

bepalen. In dat geval is een test nodig waarmee levende T. gondii kan worden aangetoond. Daar wordt de muisbioassay voor gebruikt. Dit is een internationaal aanvaarde gouden standaard voor het bepalen van de aanwezigheid van levend T. gondii. Voor het uitvoeren van de muisbioassay wordt het vlees (50-200 gram) in het laboratorium klein gesneden en met enzymen verteerd. Het weefseldigest (materiaal wat overblijft na vertering) wordt (intraperitoneaal of subcutaan) ingespoten in muizen. Na inoculatie worden de muizen gemonitord op klinische verschijnselen. Als de muizen ziek worden en doodgaan of geëuthanaseerd worden dan worden de hersenen of de buikvloeistof microscopisch of met de PCR onderzocht op T. gondii. Bloed wordt serologisch onderzocht op antilichamen. Op dit moment is de muisbioassay de enige methode waarmee onderzocht kan worden of vlees(producten) levende T. gondii bevatten of niet. Echter, de muisbioassay heeft als grootste beperking dat er levende muizen geïnoculeerd, ziek en doodgemaakt moeten worden voor de detectie. Vanuit ethisch oogpunt is dit detectiemodel ongeschikt om te gebruiken. Bovendien is deze assay duur en de uitvoerbaarheid complex. Samenvattend kan gezegd worden dat voor de onderzoeksvraag naar afdoding van T. gondii in rauwe vleeswaren tijdens de bereiding hiervan een detectiemethode nodig is. Deze methode moet in staat zijn om levende T. gondii parasieten aan te tonen. Zoals hierboven omschreven is de PCR hiervoor geen geschikte techniek en zou de muisbioassay nodig zijn. Echter, de muisbioassay is een dierproef en om ethische redenen ongewenst. Om afdoding van levende T. gondii te kunnen testen is er binnen dit project ruimte ingericht om een alternatieve proefdiervrije in vitro methode te ontwikkelen om de muisbioassay hiermee te kunnen vervangen.

Resultaten voorgaande studie

Deze aanvraag voor een projectvergunning is een vervolg op een eerdere projectvergunning. De titel van dat voorstel was "Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassay" (AVD5.1 lid2h). Het resultaat van dit werk is opgeschreven in een publicatie (Opsteegh et al., 2020). De resultaten van het eerste project zijn als basis gebruikt voor de strategie van dit vervolgproject.

De strategie van AVD5.1 lid2h bestond uit twee delen:

1. Eerst werden drie in vitro methoden voor detectie van levende T. gondii opgezet. Dit betroffen:

- celkweekmethode
- Real Time Viability (RTV) assay
- propidium monoazide-PCR (PMA-PCR).

Uit de resultaten bleek dat de PMA-methode onvoldoende specifiek was, ook dode T. gondii bleken toch nog detecteerbaar met deze PCR methode. De RTV-methode bleek niet geschikt om geïnfecteerd vlees mee te testen. De celkweekmethode bleek het meest geschikt te zijn.

2. Net als in dit project was één van de doelen om het muizenassay te vervangen door een in vitro methodiek. De gevoeligheid van de celkweekmethode en de muisbioassay werden met elkaar vergeleken. Daarnaast werd met beide methoden gekeken naar het effect van toevoegingen van zout, natriumlactaat en natriumacetaat op de levensvatbaarheid van T. gondii. Daarvoor werd (in grote lijnen) de werkwijze gevolgd om filet americain (één van de rauwe vleeswaren met een hoog risico op T. gondii) te maken in het laboratorium en bij de bereiding verschillende concentraties van zout, natriumacetaat en -lactaat te gebruiken.

Om het "filet-americain product" te maken werden herten van serologisch positieve schapen uit het slachthuis verzameld en dit vlees werd gemalen. Het hart is een voorkeursplaats voor een T. gondii infectie en de kans is dus het grootst op T. gondii positief weefsel als het hart gebruikt wordt. De herten afkomstig uit het slachthuis bleken onvoldoende bradyzoieten te bevatten om als model voor T. gondii geïnfecteerde vleeswaren gebruikt te worden.

In een tweede serie werden daarom extra T. gondii weefselcysten aan de herten toegevoegd. Met behulp van celkweek waren de effecten van de toevoegingen van zout, natriumacetaat en natriumlactaat in dit experiment niet te beoordelen, maar in de muisbioassay (in 58 muizen) bleek een grote maar onvolledige vermindering van het aantal geïnfecteerde muizen. Geen van de geteste combinatie van zout, natriumlactaat en natriumacetaat leidde tot een 100% afdoding. Zout bleek het meeste effect te hebben op de levensvatbaarheid van T. gondii.

Samenvattend kunnen de conclusies van dit project als volgt geduid worden:

- Uit de resultaten van de muisbioassay blijkt dat geen enkele geteste combinatie van zout, natriumlactaat en natriumacetaat tot een 100% afdoding leidde. Zout bleek de belangrijkste component voor afdoding van *T. gondii*. Verder testen en verdere optimalisaties zijn nodig om te bepalen bij welke concentraties van zout en andere additieven *T. gondii* wordt geïnactiveerd en de vleeswaren veiliger worden.
- Het hartweefsel van schapen uit het slachthuis bleek onvoldoende geschikt omdat het aantal weefselcysten te laag was en niet homogeen genoeg verdeeld was over het vlees. Slechts een deel van de serologisch positieve schapen was ook positief in de PCR. Extra spiking (toevoegen) met weefselcysten bleek nodig.
- De resultaten van de celkweek zijn hoopgevend voor de ontwikkeling van een alternatief voor de muisbioassay. Echter, verdere optimalisatie van de celkweekmethode is nog nodig voordat deze toegepast kan worden in de praktijk.

Literatuurlijst

- Bouwknegt, M.; Devleeschauwer, B.; Graham, H.; Robertson, L.; Giessen, J.; Lassen, B. Prioritisation of food-Borne Parasites in Europe, 2016. *Eurosurveillance* 2018, 23, doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.9.17-00161.
- Cook, A.J., Gilbert, R.E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P.A., Foulon, W., Semprini, A.E., Dunn, D.T. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *European Research Network on Congenital Toxoplasmosis*. 2000 *Bmj* 321, 142-147.
- Deng H, Swart A, Bonačić Marinović AA, van der Giessen JWB, Opsteegh M. The effect of salting on *Toxoplasma gondii* viability evaluated and implemented in a quantitative risk assessment of meatborne human infection. *Int J Food Microbiol*. 2020 Feb 2;314:108380. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108380. Epub 2019 Oct 30. PMID: 31707174.
- Dunn, D., Wallon, M., Peyron, F., Petersen, E., Peckham, C., Gilbert, R., 1999, Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet* 353, 1829-1833.
- Dubey, J.P., 1997. *Survival of Toxoplasma gondii tissue cysts in 0.85-6% NaCl solutions at 4-20 C*. *J Parasitol* 83, 946-949.
- Dubey, J.P., 2010. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. Second edition. CRC Press; 2010 313 pages. ISBN 978-1-4200-9236-3.
- Mercedes Gomez-Samblas, Susana Vilchez, Rocío Ortega-Velázquez, Màrius V. Fuentes, Antonio Osuna, Absence of *Toxoplasma gondii* in 100% Iberian products from experimentally infected pigs cured following a specific traditional process, *Food Microbiology*, Volume 95, 2021, 103665, ISSN 0740-0020, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103665>.
- Gezondheidsraad. Richtlijnen goede voeding 2015. Publicatienr. 2015/24. Den Haag.
- Havelaar AH, Galindo AV, Kurowicka D, Cooke RM. Attribution of foodborne pathogens using structured expert elicitation. *Foodborne Pathog Dis*. 2008 Oct;5(5):649-59. doi: 10.1089/fpd.2008.0115. PMID: 18687052.
- Guo M, Mishra A, Buchanan RL, Dubey JP, Hill DE, Gamble HR, Jones JL, Du X, Pradhan AK. Development of Dose-Response Models to Predict the Relationship for Human *Toxoplasma gondii* Infection Associated with Meat Consumption. *Risk Anal*. 2016 May;36(5):926-38. doi: 10.1111/risa.12500. Epub 2015 Oct 19. PMID: 26477997
- Havelaar, A.H., Kirk, M.D., Torgerson, P.R., Gibb, H.J., Hald, T., Lake, R.J., Praet, N., Bellinger, D.C., de Silva, N.R., Gargouri, N., Speybroeck, N., Cawthorne, A., Mathers, C., Stein, C., Angulo, F.J., Devleeschauwer, B., 2015. World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. *PLoS Med* 12, e1001923.
- Havelaar, A H, Haagsma, J A, Mangen, M J, Kemmeren, J M, Verhoef, L P, Vijgen, S M, Wilson, M, Friesema, I H, Kortbeek, L M, van Duynhoven, Y T, van Pelt, W, 2012. Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009. *Int. J. Food Microbiol*. 156, 231-238.
- Hill, D.E., Benedetto, S.M., Coss, C., McCrary, J.L., Fournet, V.M., Dubey, J.P., 2006. Effects of time and temperature on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in enhanced pork loin. *J Food Prot* 69, 1961-1965.
- Hill, D.E., Sreekumar, C., Gamble, H.R., Dubey, J.P., 2004. Effect of commonly used enhancement solutions on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork loin. *J Food Prot* 67, 2230-2233.
- Kijlstra A, Eissen OA, Cornelissen J, Munnikma K, Eijck I, Kortbeek T. *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Sep;45(9):3165-9. doi: 10.1167/iovs.04-0326. PMID: 15326136.

- Lagerweij, G.R., Pijnacker, R., Friesema, I.H.M., Mughini Gras, L. and Franz, E. Disease burden of food-related pathogens in the Netherlands, 2019, RIVM letter report 2020-0117.
- Lindsay DS, Kaur T, Mitchell SM, Goodwin DG, Strobl J, Dubey JP. Buprenorphine does not affect acute murine toxoplasmosis and is recommended as an analgesic in *Toxoplasma gondii* studies in mice. *J Parasitol.* 2005 Dec;91(6):1488-90. doi: 10.1645/GE-732R.1. PMID: 16544426.
- NVWA rapport. Monitoring van het gehalte aan keukenzout in diverse levensmiddelen. 2016
- Neumayerová, H., Juránková, J., Saláková, A., Gallas, L., Kovařík, K., Koudela, B., 2014. Survival of experimentally induced *Toxoplasma gondii* tissue cysts in vacuum packed goat meat and dry fermented goat meat sausages. *Food Microbiology* 39, 47-52.
- Opsteegh, M, Teunis, P, Mensink, M, Zuchner, L, Titilincu, A, Langelaar, M, Van der Giessen, J, 2010. Evaluation of ELISA test characteristics and estimation of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in Dutch sheep using mixture models. *Prev. Vet. Med.* 96, 232–240
- Opsteegh, M., Prickaerts, S., Frankena, K., Evers, E.G., 2011. A quantitative microbial risk assessment for meatborne *Toxoplasma gondii* infection in The Netherlands. *International journal of food microbiology* 150, 103-114.
- Opsteegh M, Dam-Deisz C, de Boer P, DeCraeye S, Faré A, Hengeveld P, Luiten R, Schares G, van Solt-Smits C, Verhaegen B, Verkleij T, van der Giessen J, Wisselink HJ. Methods to assess the effect of meat processing on viability of *Toxoplasma gondii*: towards replacement of mouse bioassay by in vitro testing. 2020 doi: 10.1016/j.ijpara.2020.04.001
- Pott, S., Koethe, M., Bangoura, B., Zoller, B., Daugschies, A., Straubinger, R.K., Fehlhaber, K., Ludewig, M., 2013. Effects of pH, sodium chloride, and curing salt on the infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *J Food Prot* 76, 1056-1061.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000;30:1217-58.
- Torgerson PR, Mastroiacovo P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bull World Health Organ.* 2013 Jul 1;91(7):501-8. doi: 10.2471/BLT.12.111732. Epub 2013 May 3. PMID: 23825877; PMCID: PMC3699792.
- World Health Organization (WHO) Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases 2015.

3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

Hoofddoelstellingen

1. Het vergroten van de voedselveiligheid door beheersing van *T. gondii* risico's in rauwe vleeswaren. Dit doel wordt bereikt door het effect van huidige procesmaatregelen (o.a. het toevoegen van zout) op de bereiding van rauwe vleeswaren te bepalen en zo nodig verder te optimaliseren.
2. De traditionele muisbioassay wordt vervangen door een proefdier vrij alternatief, namelijk de celkweek methode, zodat procesmaatregelen voor de bereiding van vleeswaren in het laboratorium getest kunnen worden en dit niet meer hoeft in een dier.

Subdoelstellingen

1. Optimaliseren van de celkweek
2. Een diermodel opzetten om onder experimentele omstandigheden voldoende *T. gondii* besmet weefsel te verkrijgen.
3. Met het verkregen *T. gondii* vlees nagaan welke concentraties van zout en andere additieven *T. gondii* inactiveren en daarmee de vleeswaren veiliger maken. Deze tests worden in eerste instantie uitgevoerd met behulp van de celkweek.
4. Confirmatie van de resultaten verkregen met de celkweek (subdoel 3) met de muisbioassay. De muisbioassay is de 'gouden standaard'. De resultaten van afdoding van *T. gondii* door procesmaatregelen zal getest worden in de celkweek en vergeleken worden met de muisbioassay.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

Samenwerkingspartners

Dit project is een PPS (publiek private samenwerking) waarbij samengewerkt wordt tussen het bedrijfsleven en onderzoeksinstituten. De overheid financiert 50% van de kosten van dit onderzoek. Vanwege het belang van dit onderzoek voor de voedselveiligheid nemen deel en dragen financieel bij partijen uit de Nederlandse vleesverwerkende industrie. **Dat betreft twee vertegenwoordigende organisaties en vier verschillende producenten van vleeswaren. Daarnaast nemen vier onderzoeksinstituten deel.** Het is dus een studie voor en samen met de Nederlandse vleeswarenindustrie. De resultaten zullen gebruikt worden door de vleeswarenindustrie. In de afgelopen jaren heeft de Nederlandse overheid (Ministerie van VWS) vragen gesteld aan de vleeswarensector over de preventie van T. gondii risico's in rauwe vleeswaren. Dit was voor de sector mede aanleiding om het bovengenoemde PPS project te starten. Het plan voor dit project is bekend gemaakt aan de overheid en de vleeswarensector zal de resultaten terug te koppelen naar de overheid.

Kennis en expertise

- **Kennisinstelling 1** is het kennis- en expertisecentrum van T. gondii infecties, dit betreft T. gondii infecties in mensen en in dieren. De kennis en expertise is inclusief ontwikkeling en toepassing van diagnostische testen voor T. gondii. Voor dit project vindt de ontwikkeling en de optimalisatie van de celkweek plaats bij het RIVM. Er is ruime ervaring bij het RIVM met de celkweek van T. gondii tachyzoieten en tijdens het vorige project is er ervaring opgedaan met de celkweek van bradyzoieten.
- **Kennisinstelling 2** heeft ook veel kennis en expertise op het gebied van T. gondii. Daarnaast heeft **5.1 lid2h** de faciliteiten en kennis voor de uitvoering van dierproeven, ook met de muisbioassay voor T. gondii studies. De uitvoering van de dierproeven zal plaatsvinden bij **5.1 lid2h**
- **Kennisinstellingen 3 en 4** brengen vleestechnologische en microbiologische kennis en ervaring in om vleeswaren te kunnen produceren. Dit is inclusief kennis van vleeswaren die rauw geconsumeerd kunnen worden.
- Detailinformatie en kennis over de bereiding en recepturen van de rauwe vleeswaren is beschikbaar bij de vleeswarenbedrijven die betrokken zijn bij dit project.

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project? No Yes > Describe which laws and regulations apply and describe the effect on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

3.3 Relevance

3.3.1 What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

- T. gondii wordt nationaal en internationaal erkend als een belangrijke voedselpathogeen (zie sectie 3.1). De hoge humane ziektelast maakt het noodzakelijk dat er maatregelen worden genomen om T. gondii infecties te voorkomen.
- Ook wordt breed erkend dat beheersing van T. gondii risico's van rauw geconsumeerde vleesproducten gewenst is (zie ook sectie 3.1)
- Voor de vleeswarensector is het urgent en belangrijk om te weten of de huidige procesmaatregelen voor de bereiding van rauwe vleeswaren, eventueel met kleine aanpassingen van de receptuur, voldoende zijn om het risico voor de consument te beheersen.
- De overheid neemt maatregelen om de veehouderij diervriendelijker en duurzamer te maken. Verduurzamen van de veehouderij betekent waarschijnlijk ruimte voor het natuurlijke gedrag van koeien, varkens en kippen en zorg voor hun specifieke behoeften en daarmee wordt buitenloop gestimuleerd. Meer buitenloop van dieren betekent meer risico op een T. gondii besmetting. T. gondii oöcysten komen voor in het milieu en bijvoorbeeld in de biologische varkenshouderij hebben varkens de mogelijkheid om buiten te lopen. Juist bij deze varkens komen meer T. gondii infecties voor (Kijlstra et al., 2004).
- Er is al meerdere jaren extra aandacht voor de hoeveelheid zout in voedingsmiddelen. De Gezondheidsraad beveelt aan om het gebruik in Nederland te beperken ter voorkoming of terugdringing van een hoge bloeddruk en ter vermindering van de kans op hart- en vaatziekten (Gezondheidsraad, 2015). Nederlandse vleeswarenproducenten werken aan het verder terugdringen

van de zoutgehaltes in hun producten. Dit project is van waarde voor de vleeswarenindustrie omdat duidelijk wordt hoeveel zout er nodig is om T. gondii in rauwe vleeswaren af te doden. De verworven kennis van dit project kan gebruikt worden om onder- of overdosering te voorkomen.

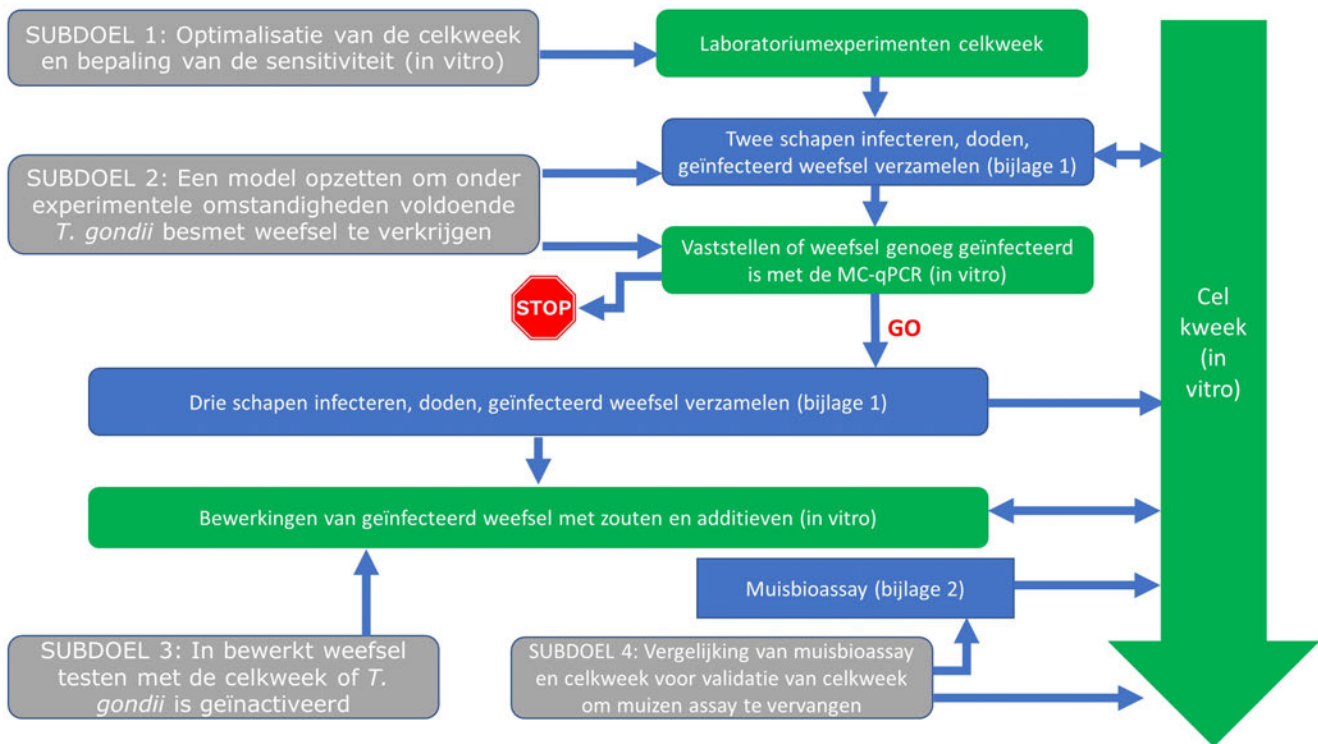
- Het risico van T. gondii in rauwe vleeswaren heeft de aandacht van de Nederlandse overheid, deze heeft vragen gesteld aan de vleeswarenssector over de preventie van T. gondii risico's in rauwe vleeswaren.
- De ontwikkeling van een in vitro methode als vervanging van de muisbioassay is voorwaardenscheppend voor de hoofddoelstelling, namelijk zorgen dat rauw geconsumeerde vleeswaren veiliger worden.
- De evaluatie van procesmaatregelen voor beheersing van T. gondii risico's in rauw gegeten vleeswaren en eventueel het aanpassen hiervan.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

- De vleeswarenssector (1): Het belang is om veilig voedsel van hoge kwaliteit te produceren.
- De vleeswarenssector (2): Producenten van rauwe vleesproducten hebben de verantwoordelijkheid om T. gondii voedselveiligheidsrisico's van rauwe vleeswaren te beheersen. Een belangrijk onderdeel van het verder bevorderen van de voedselveiligheid voor hen is een rekenmodel waaruit afgeleid kan worden welke procesmaatregelen effectief zijn voor het afdoden van T. gondii bij de bereiding van rauwe vleeswaren.
- Proefdieren: De ontwikkeling van de celkweek als alternatief voor de muisbioassay om levende T. gondii parasieten aan te tonen maakt het mogelijk voor de producenten om aanvullende testen uit te kunnen laten voeren zonder dat de muisbioassay nog nodig is.
- Landbouwhuisdieren: Beheersing van T. gondii risico's in de vleesproductieketen is op twee manieren mogelijk: 1) door de buitenloop van deze dieren te beperken en 2) door te zorgen voor een T. gondii veilige productie van vleeswaren. Vanuit dierenwelzijnsbelangen is beheersing van T. gondii risico's bij de productie van vleeswaren te prefereren.
- De wetenschap (1): Het belang is dat er nieuwe inzichten worden verworven over het beheersen van T. gondii risico's in rauwe vleeswaren.
- De wetenschap (2): Het belang is dat er een alternatieve test voor de muisbioassay ter beschikking komt. Dat de ontwikkeling van alternatieven voor de muisbioassay steeds meer urgent wordt blijkt bijvoorbeeld uit het sluiten van de kat assay faciliteit bij de USDA (<https://www.usda.gov/media/pressreleases/2019/04/02/ars-announcestoxoplasmosis-research-review-discontinues-research>).
- De wetenschap (3): Het belang is dat de resultaten van deze studie als input gebruikt kunnen worden voor de QMRA, die bij het RIVM is ontwikkeld. Op die manier kan opnieuw worden bepaald welke producten de grootste bijdrage leveren aan infecties in de bevolking.
- De consument: Het belang is veilig voedsel van hoge kwaliteit.
- De maatschappij (1): Het belang is vermindering van de ziektelast en kosten in de gezondheidszorg ten gevolge van T. gondii infecties.
- De maatschappij (2): Het belang is dat er een proefdiervrij alternatief voor de muisbioassay ter beschikking komt, wat vanuit ethisch oogpunt gewenst is.
- De overheid (1): Het belang is dat zij haar verantwoordelijk na kan komen om te zorgen voor voedselveiligheid.
- De overheid (2): De kennis die is opgedaan in dit project kan de overheid gebruiken om preventiestrategieën te bepalen.

3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.



Beschrijving subdoelen

- Onder 3.2.1 zijn 4 subdoelen beschreven. Hieronder worden ze verder uitgewerkt.
- Bij ieder subdoel zijn milestones (voorziene resultaten) beschreven. Deze milestones zijn nodig om het volgende onderdeel uit te kunnen voeren en de milestones dienen daarom behaald te worden voordat gestart kan worden met het volgende onderdeel.
- Alleen bij subdoel 2 is een go-nogo opgenomen. Bij dit subdoel is dit alleen relevant, bij de overige niet.

Subdoel 1: Optimalisatie van de celkweek en bepaling van de sensitiviteit (in vitro)

- In dit onderdeel wordt de celkweekmethode op de verschillende groeistadia van *T. gondii* (tachyzoieten, bradyzoieten) geoptimaliseerd en wordt de detectielimiet bepaald van de celkweek op tachyzoieten en bradyzoieten. Deze experimenten worden uitgevoerd met vlees van *T. gondii* negatieve dieren waar tachyzoieten of bradyzoieten aan toe worden gevoegd. Hiervoor zijn geen dierexperimenten noodzakelijk.
- Voor de uitvoer van dit onderdeel wordt gebruik gemaakt van de ervaring die is opgedaan in het eerste project. Toen bleek dat vooral schimmelvorming in de celkweek een probleem was. In dit in vitro onderdeel wordt getest hoe dit voorkomen kan worden. Ook zal nagegaan worden welk enzym het beste gebruikt kan worden voor digestie (vertering) van vlees.
- In dit in vitro deel wordt zowel de celkweek met tachyzoieten als met bradyzoieten uitgevoerd. De kweek met bradyzoieten is vooral relevant omdat dit het infectiestadium is van de parasiet die aangetoond dient te worden in vlees van de dieren. De kweek met tachyzoieten wordt uitgevoerd omdat er al veel ervaring is met de celkweek van dit infectiestadium.

Milestones:

- Een protocol voor digestie (vertering) van vlees
- Geoptimaliseerde protocollen voor celkweek van tachyzoieten en bradyzoieten
- Bepaling van sensitiviteit (detectielimiet) van de celkweek op tachyzoieten en bradyzoieten in gespiked vlees

Subdoel 2: Een diermodel opzetten om onder experimentele omstandigheden voldoende *T. gondii* besmet weefsel te verkrijgen.

- Ervaring met het slachthuismateriaal was dat er onvoldoende betrouwbaar positieve schapen konden worden verkregen en dat de concentratie van weefselcysten te laag was voor de experimenten met de procesmaatregelen.
- De verwachting is dat de concentratie weefselcysten in experimenteel geïnficeerde schapen

hoger is, in een experimentele studie is de infectiegraad beter te sturen en dat maakt de kans op succes groter.

- In de literatuur (Dubey, 2009) wordt vermeld dat de kans erg groot is dat een infectie aanslaat maar hoe hoog de concentratie is van T. gondii in het vlees en welke weefsels positief worden en vervolgens of dit voldoende is voor het uitvoeren van de experimenten met procesmaatregelen is niet duidelijk.
 - Om die reden zullen twee schapen geïnfecteerd worden met T. gondii en zal bepaald worden met de MC-qPCR welke weefsels (hart, middenrif en meerdere spierweefsels) positief zijn. Vervolgens zal met de celkweek nagegaan worden wat de gevoeligheid is van de celkweek op dit materiaal. Om dit te bepalen zullen de resultaten van de MC-qPCR en de weefselkweek met elkaar vergeleken worden. Ook zal de qPCR uitgevoerd worden op digest wat in de weefselkweek gebruikt wordt om een goede indicatie te krijgen van de sensitiviteit van de celkweek.
 - De infectie in de beide schapen zal serologisch vervolgd worden, daarvoor zullen bloedmonsters genomen worden van de schapen en getest worden op antilichamen tegen T. gondii. Een positieve serologie duidt op een succesvolle infectie. Alleen vlees van serologisch positieve schapen kan gebruikt worden voor uitvoeren van de verschillende procesmaatregelen.
 - Na 10 weken zal euthanasie van de schapen plaatsvinden in de sectiezaal van 5.1 lid2h Het hart, middenrif en spiervlees zal worden klaargemaakt voor de experimenten in het laboratorium. Milestones: Uitvoering van MC-qPCR op hart, middenrif en spiervlees en bepaling sensitiviteit van de celkweek.
- GO: MC-qPCR is positief op één of meerdere weefsels.
NO-GO: MC-qPCR is negatief op alle onderzochte weefsels.

Subdoel 3: Met het verkregen T. gondii weefsel nagaan welke concentraties van zout en andere additieven T. gondii inactiveren en daarmee de vleeswaren veiliger maken. Deze tests worden alleen uitgevoerd met behulp van de celkweek.

- In overleg met de producenten van vleeswaren zijn 16 procesmaatregelen opgesteld die getest zullen worden op afdoding van T. gondii in de celkweek. Deze bevatten een reeks aan NaCl concentraties, en toevoeging van natriumlactaat en natriumacetaat bij een vaste concentratie NaCl (zie voor details 3.4.2). De gekozen combinaties komen overeen met de recepturen van de producenten van vleeswaren. De resultaten van het onderzoek zijn dus in de praktijk toepasbaar.
 - Deze experimenten vinden dus alleen plaats met de celkweek en nog niet in de muisbioassay.
 - De resultaten van de celkweek geëvalueerd worden en er zal besloten worden welke procesmaatregelen voldoende aanknopingspunten bieden om de verkregen resultaten te confirmeren in de muisbioassay. Maatregelen die met behulp van de celkweek niet effectief blijken hoeven niet in de muisbioassay bevestigd te worden, hiermee worden worden muizen bespaard.
- Milestones:
- Effect procesmaatregelen op de afdoding van bradyzoieten met behulp van celkweek.
 - Lijst met procesmaatregelen die geconfirmeerd zullen worden in de muisbioassay.

Subdoel 4: Confirmatie van de resultaten verkregen met de celkweek (subdoel 3) met de muisbioassay. De muisbioassay is de 'gouden standaard'. De resultaten van afdoding van T. gondii door procesmaatregelen zal getest worden in de celkweek en vergeleken worden met de muisbioassay.

- In dit onderdeel wordt de bepaling van de detectielimiet van de celkweek herhaald (zie subdoel 3) en vergeleken met de detectielimiet in de muisbioassay.
- Ook zal er een confirmatie plaatsvinden van de bevindingen van subdoel 3, als validatie van de resultaten van de celkweek. De resultaten van afdoding van T. gondii door procesmaatregelen zal getest worden in de celkweek en vergeleken worden met de muisbioassay.

Milestones:

- Op basis van de vergelijking van de detectielimiet zullen conclusies getrokken worden over de mogelijkheden om de muisbioassay te vervangen door de celkweek.
- Voor de verschillende procesmaatregelen worden de resultaten uit celkweek en muisbioassay gebruikt om een conclusie te trekken wat betreft effectiviteit van afdoding.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

Natuurlijk geïnfecteerd T. gondii positief schapenvlees

- In paragraaf 3.1 wordt beschreven hoe in het voorgaande project AVD5.1 lid2h geïnfecteerd weefsel is verkregen, namelijk door middel van slachthuis materiaal (schapen harten).

- Het doel in het voorgaande project was om vlees van natuurlijk T. gondii geïnfecteerde dieren te gebruiken. De voorkeur ging daarbij uit naar rundvlees (omdat filet americain hiervan gemaakt wordt), echter het aantal levende T. gondii infecties in rund is erg laag en daarom is het niet mogelijk om T. gondii geïnfecteerd rundvlees te verkrijgen.
- Schapen werden geselecteerd omdat bekend is dat de seroprevalentie bij schapen hoog is (Opsteegh et al., 2010) en dat er een goede overeenstemming is tussen de detectie van antilichamen en de aanwezigheid van T. gondii. Bovendien is het hart geïdentificeerd als voorkeursplaats (Opsteegh et al., 2016).
- Helaas bleek tijdens de uitvoering van de experimenten de hoeveelheid geïnfecteerd vlees laag en er was extra spiking (toevoeging) met weefselcysten nodig.
- Redenen voor het beperkte aantal positieve schapen zijn dat de concentratie van weefselcysten bij positieve dieren te laag was en dat de verdeling van weefselcysten over het vlees niet homogeen was.

Experimenteel geïnfecteerd T. gondii positief schapenvlees

- Voor dit vervolgproject is de vervangende strategie om schapen experimenteel te infecteren met T. gondii.
- Door dit te doen is de verwachting dat deze dieren een meer betrouwbare bron van T. gondii positief vlees zijn dan harten van schapen uit het slachthuis.
- Dit omdat van schapen die experimenteel geïnfecteerd zijn met T. gondii het zeker is dat er een infectie heeft plaatsgevonden en er van de positieve dieren naast het hart veel spiermateriaal beschikbaar is.
- Van harten uit het slachthuis is niet bekend of het schaap geïnfecteerd was met T. gondii en hoe hoog de concentratie van bradyzoieten was. Deze concentratie kan variëren van laag naar hoog.
- Met een experimentele infectie daarentegen kan gemikt worden op een hoge concentratie weefselcysten in het vlees van het schaap. Dit kan door een relatief hoge infectiedosis te gebruiken. In Opsteegh et al., 2016 worden challenge experimenten beschreven in schapen met 5×10^5 oöcysten. Deze relatief hoge challenge dosis werd succesvol gebruikt om de verspreiding van T. gondii naar zoveel mogelijk weefsels te realiseren. Esteban-Redondo et al., (1999) vond vaker T. gondii in schapen geïnfecteerd met een dosis van 5×10^5 dan in schapen geïnfecteerd met 5×10^3 oöcysten.
- Een hogere dosis leidt niet tot meer klinische symptomen na infectie. Benavides et al., 2011 gebruikte 5×10^3 en 5×10^5 oöcysten om schapen te infecteren en had de ervaring dat bij beide challenge doses er alleen een temperatuurverhoging werd gemeten gedurende enkele dagen.
- Er worden dus meer weefselcysten gevonden bij een hogere dosis en een hogere dosis geeft geen aanleiding tot een hogere ziektelast voor het schaap.

Challenge periode

Uit gegevens in de literatuur blijkt dat na infectie met T. gondii schapen 6 weken of langer (12 weken, 6 maanden) aangehouden voordat euthanasie plaatsvindt (Dubey et al., 2009; Esteban-Redondo 1999). Uit onderzoek van weefsels van de schapen op 6 weken of 6 maanden na infectie bleek geen verschil in de verspreiding van T. gondii (Esteban-Redondo et al., 1999).

Schapen of varkens infecteren

Uit de literatuur blijkt dat ook varkens experimenteel geïnfecteerd kunnen worden om T. gondii positief vlees te verkrijgen. Net als schapen ontwikkelen varkens beperkte klinische symptomen en bij beide behoort een orale infectie met oöcysten tot de natuurlijke mogelijkheden voor een T. gondii infectie (Dubey, 2010). De voorkeur gaat echter uit naar schapen vanwege de opgedane ervaringen in het eerste project.

De celkweekmethode uitgelegd

T. gondii is een intracellulaire parasiet en voor de kweek in het laboratorium zijn cellen nodig voor de groei van T. gondii. Voor dit project worden RK13 en Vero cellen gebruikt. Beide cellijnen komen oorspronkelijk uit dieren, maar worden proefdiervrij uit de stikstofcollectie opgekweekt en vermeerderd.

In een celkweek worden cellen in het laboratorium opgekweekt: deze cellen worden in een kweekschaal gebracht in een vloeibaar groeimedium. De cellen gaan zich vermenigvuldigen en vormen een monolayer (een laag) van cellen op de bodem van de kweekschaal. De beoordeling van

de groei van de cellen in de celkweek gebeurt met de microscoop. Wanneer de monolayer ongeveer de hele fles bedekt worden tachyzoiten, bradyzoiten of het digest van geïnfecteerd vlees opgebracht. De tachyzoiten of bradyzoiten dringen de cellen binnen en vermenigvuldigen zich intracellulair tot zij de cel verlaten en volgende cellen infecteren. Groei van *T. gondii* kan waargenomen worden doordat de cellen doodgaan. Het doodgaan van de cellen duidt er op dat er beschadigingen zijn, dat heeft dus een soort signaalfunctie dat er iets met de cellen aan de hand is. Uitleesparameter voor de groei is een qPCR (quantitative PCR). Hiermee kan kwantitatief de hoeveelheid *T. gondii* DNA bepaald worden in een monster. Gedurende drie weken, wordt iedere week een deel van het kweekmedium weggenomen en wordt bepaald hoeveel *T. gondii* DNA aanwezig is. Groei van tachyzoieten of bradyzoieten in een weefselkweek wordt gekenmerkt door een toename van *T. gondii* DNA in het kweekmedium in de loop van de tijd. Dat kan dus worden afgelezen uit de resultaten van de qPCR.

Perspectief van de celkweekmethode

De celkweek kan de muisbioassay vervangen. In het kader van de *T. gondii* voedselveiligheid van vlees wordt de muisbioassay gebruikt voor:

- Referentietest voor de validatie van diagnostische testen (PCR, ELISA).
- Pathogenese en prevalentie studies om na te gaan welke dieren en welke organen van dieren geïnfecteerd zijn met *T. gondii*. Hierbij wordt soms eerst gebruik gemaakt van serologie of PCR, maar wordt muisbioassay gebruikt om te bepalen of de aanwezigheid van antilichamen of parasitair DNA ook betekent dat er infectieuze *T. gondii* aanwezig is.
- Inactivatiestudies van *T. gondii* in vlees, zoals de studie die wij willen uitvoeren. In deze studie onderzoeken we het effect van zout, lactaat en acetaat. Echter, hier houdt het onderzoek niet mee op. Er kunnen ook andere toevoegingen (andere conserveringszouten of bijvoorbeeld specerijen en saus) en bewerkingen (drogen, roken, vriezen, verhitten, fermenteren) onderzocht worden met de muis bioassay.

Bij al deze toepassingen kan een celkweek de muisbioassay vervangen. Daarnaast is het mogelijk dat de muisbioassay op kleinere schaal wordt gebruikt omdat de celkweek al een heel aantal antwoorden geeft. In dat geval is er dus een vermindering in plaats van een complete vervanging. Bovendien is het mogelijk om met een celkweek meer variaties te onderzoeken dan met een muisbioassay kan gebeuren. Een muisbioassay is altijd beperkend in het aantal monsters. Afrondend kan gezegd worden dat er veel perspectief is voor de celkweekmethode.

Detectielimiet van de muisbioassay

Inderdaad is er kennis over de detectielimiet van de muisbioassay. Een voorbeeld daarvan is een publicatie van Guo et al., 2016, waarnaar verwezen wordt in bijlage 2 (DAP muisbioassay onder A). Echter, uit de literatuur is ook duidelijk dat de detectielimiet kan verschillen, onder andere door verschillen in virulentie van de gebruikte *T. gondii* stammen en de gevoeligheid van de gebruikte muizen voor een *T. gondii* infectie. Er is geen vaste waarde die onder alle omstandigheden geldig is. Ons hoofddoel is niet het bepalen van de detectielimiet van de muisbioassay, maar de vergelijking tussen de detectielimiet van muisbioassay en celkweek. Voor een dergelijke test dienen zowel de celkweek als de muisbioassay parallel aan elkaar uitgevoerd te worden met hetzelfde uitgangsmateriaal. Pas dan kan op een verantwoorde wijze een conclusie getrokken worden over de detectielimiet in de muisbioassay en in de celkweek.

De informatie uit Guo et al., 2016 heeft ons geholpen om de reeks te bepalen die we willen testen. Het gaat hier om een range van 10 tot 10.000 bradyzoieten. Daarnaast is het voornemen om ook de invloed van vleesdigest op de detectielimiet te bepalen.

Lijst met procesmaatregelen

In overleg met de producenten van vleeswaren zijn 16 procesmaatregelen opgesteld die getest zullen worden op afdoding van *T. gondii* in de celkweek. Deze bevatten een reeks aan NaCl concentraties, en toevoeging van natriumlactaat en natriumacetaat bij een vaste concentratie NaCl (zie figuur hieronder). De zoutconcentraties zijn zodanig gekozen dat ze de belangrijkste recepturen van de vier bij dit project betrokken producenten van vleeswaren omvatten. Tijdsstechnisch gezien kan er één serie gebeuren op een dag. Voor het uitvoeren van de testen zijn er per serie 4 controles nodig, totaal 8.

Zoals uit het schema valt af te lezen zijn er drie groepen met 1.2% NaCl, verdeeld over twee series. De reden om deze concentratie drie keer te testen is als volgt:

- * Serie 1 gebeurt op de ene dag en serie 2 op de volgende dag. Praktisch gezien is het onhaalbaar om beide series op één dag te doen, daarom is het verdeeld.
- * Verder dient er rekening gehouden te worden met variaties per dag omdat het startmateriaal kan verschillen. Om die reden willen we graag de complete serie van zoutconcentraties testen op dag 1 en er niet één tussen uit halen om daar de resultaten van een andere dag bij in te voegen, zoals u voorstelt.
- * Tot slot willen we opmerken dat in serie 2 wordt nagegaan wat het additionele effect is van lactaat en acetaat aan de inactivatie met zout op T. gondii. Zout is waarschijnlijk het meest belangrijk voor inactivatie maar van lactaat en acetaat wordt verwacht dat deze ook een effect hebben. Om dit goed te testen voeren we die bepalingen in duplo uit. En daarbij is dus ook 1.2% zout nodig, anders is het niet mogelijk om het additionele effect van lactaat en acetaat te bepalen.

Het klopt dat de levensmiddelenindustrie werkt aan verlaging van zout in voeding, ook in vleeswaren.

Bij het opstellen van de 16 procesmaatregelen is gebruik gemaakt van de huidige recepturen van vier bij dit project betrokken vleeswarenfabrikanten. De zoutreeks is in overleg met hen vastgesteld.

In filet americain is de zoutconcentratie meestal tussen 1,2 en 1,8%, maar kan ook 2.5% zijn. Vanuit literatuur is bekend dat 2 % zout T. gondii afdood. Die 2% is met name gebaseerd op twee artikelen (Hill et al., 2006; Hill et al., 2004), maar er is ook literatuur waarin 2% nog niet volledig effectief blijkt (Dubey, 1997; Neumayerová et al., 2014; Pott et al., 2013). In onze eigen experimenten uit het voorgaande project (AVD5.1 lid2h) zagen we bij de hoogste NaCl concentratie (1.6% NaCl i.c.m. lactaat en acetaat; methode III) nog geen volledige inactivatie (Opsteegh et al., 2020). We verwachten dus dat er in de range van 2 tot 3% NaCl nog wel verschillen in effectiviteit zijn. Om het effect van zout op de overleving van Toxoplasma te kunnen modelleren (een dosis-respons model), en zo op basis van onze resultaten ook de effectiviteit van tussenliggende concentraties te kunnen voorspellen, is een range aan concentraties nodig waarbij de hoogste concentratie in ieder geval volledig effectief is. Op die manier zijn we op de reeks van 0,6% tot 2,7% NaCl uitgekomen. Deze range is in de praktijk relevant omdat ook 2,5% NaCl in filet americain recepten wordt gebruikt. Een zoutconcentratie van 3% zou zeker effectief moeten zijn. Een volledig effectieve zoutconcentratie is een belangrijke controle in de experimenten en nodig voor de modellering van het effect van zout.

We wijzen er op dat dit project van waarde is voor de vleeswarenindustrie omdat duidelijk wordt hoeveel zout er nodig is om T. gondii in rauwe vleeswaren af te doden. Juist in het licht van de trend naar vermindering van zout is onderdosering een risico en moet overdosering worden voorkomen.

Zout in vleeswaren

Wat betreft de zoutconcentraties in de praktijk is er een convenant productverbetering afgesloten tussen de overheid (VWS) en de levensmiddelenindustrie (FNLI). Hierin zijn inspanningen afgesproken om het zoutgehalte en het verzadigd vetgehalte van een groot aantal producten stapsgewijs te verlagen. Er is een wetenschappelijke adviescommissie samengesteld die het akkoord verbetering productsamenstelling begeleidt.

<https://www.akkoordverbeteringproductsamenstelling.nl/organisatie/wetenschappelijke-adviescommissie>. Jaarlijks heeft de NVWA en het RIVM onderzoek uitgevoerd naar de voortgang. In een NVWA rapport uit 2016 (Monitoring van het gehalte aan keukenzout in diverse levensmiddelen) staat beschreven wat het gemiddelde zoutgehalte (bepaling van gehalte natrium * 2,5) is in 960 bemonsterde en gemeten vleeswaren, nl 1,28 gram zout per 100 gram. De laagst gemeten waarde was 0,03 gram zout per 100 gram, de hoogst gemeten waarde 7,93 gram zout per 100 gram product. Deze gemeten waarden van 2016 zijn 10 % lager dan gemeten in 2011, de trend gaat de goede kant op.

In het met de overheid afgesloten convenant zijn de "rauwe" gezouten vleeswaren in verband met voedselveiligheid uitgesloten van het programma om het zoutgehalte te verlagen. Producten zoals runderrookvlees, paardenrookvlees, bressoala, rauwe ham, ontbijtspek zijn niet veilig te produceren en te bewaren met een zoutgehalte onder de 3%. Deze producten hebben een zoutgehalte uiteenlopend van 3,5% tot 5%.

	Serie 1		Serie 2
D1	Negatief	D13	Negatief
D2	Negatief + weefselcysten	D14	Negatief + weefselcysten
D3	Positief onbehandeld	D15	Positief onbehandeld
D4	Positief onbehandeld	D16	Positief onbehandeld
D5	0.9% NaCl	D17	1.2% NaCl + 1.2% lac
D6	1.2% NaCl	D18	1.2% NaCl + 1.2% lac
D7	1.5% NaCl	D19	1.2% NaCl + 2% lac
D8	1.8% NaCl	D20	1.2% NaCl + 2% lac
D9	2.1% NaCl	D21	1.2% NaCl + 1.2% lac + 0.4% ac
D10	2.4% NaCl	D22	1.2% NaCl + 1.2% lac + 0.4% ac
D11	2.7% NaCl	D23	1.2% NaCl
D12	3.0% NaCl	D24	1.2% NaCl

3.4.3 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	Toxoplasma gondii infectie van schapen
2	Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay

Naam van het project	Bepalen van het effect van zout en andere toevoegingen in rauwe vleeswaren op Toxoplasma gondii met een nieuwe proefdiervrije methode.
NTS-identificatiecode	NTS-NL-836309 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Voedselveiligheid Toxoplasma gondii Celkweek Vleeswaren
Doel(en) van het project	Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Besmettelijke ziekten van de mens

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

<p>Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).</p>	<p>Toxoplasma gondii is een parasiet en deze ziekteverwekker kan voorkomen in rauw gegeten vleeswaren zoals filet americain, ossenworst en rauwe ham. In Nederland staat T. gondii op de tweede plaats na Campylobacter op de ranglijst van 14 door voedsel overgedragen ziekteverwekkers. T. gondii is de veroorzaker van toxoplasmose en vrijwel alle warmbloedige dieren, inclusief mensen kunnen besmet worden. Ongeveer een derde van de wereldbevolking is geïnfecteerd met deze parasiet. Zwangere vrouwen en mensen die door andere ziektes een sterk verminderde afweer hebben vormen de belangrijkste risicogroepen.</p> <p>Ondanks waarschuwingen vanuit de overheid (Voedingscentrum en RIVM) voor de risico's op een T. gondii infectie worden binnen Nederland maar ook wereldwijd veel rauwe vleeswaren gegeten.</p> <p>Het RIVM onderzoekt elk jaar hoeveel mensen ziek worden of sterven aan ziekteverwekkers die via voedsel worden overgedragen. Zij stellen vast dat de ziektelast van T. gondii door het eten van rauwe vleeswaren nog steeds te hoog is. Kennisinstellingen en de vleeswarenindustrie hebben daarom een samenwerkingsverband gevormd om de voedselveiligheid, dus het doden van T. gondii in rauwe vleeswaren, te verbeteren.</p> <p>In dit onderzoek wordt gezocht naar een manier om T. gondii te doden in rauwe vleeswaren. Daarvoor wordt het effect van zout en andere toevoegingen tijdens de bereiding van rauwe vleeswaren bepaald op de afdoding van T. gondii. In een eerdere studie is al gebleken dat het effect van zout groot is op afdoding van T. gondii. Dit onderzoek zullen we vervolgen en nagaan welke minimale concentraties zout en andere toevoegingen voldoende afdoding van T. gondii in vlees opleveren.</p> <p>Om de besmettelijkheid van T. gondii aan te tonen wordt er tot op heden gebruik gemaakt van een dierproef met muizen. In dit project wordt onderzocht of deze dierproef kan worden vervangen door een proefdiervrij alternatief, namelijk een celkweek. In ons onderzoek zal dit alternatief worden getest om te bewijzen dat deze inderdaad een geschikte vervanging is.</p> <p>De doelstellingen van dit project zijn:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Een diermodel met schapen opzetten om voldoende T. gondii besmet vlees te verkrijgen. Op deze
---	--

wijze wordt de werkelijke situatie van T. gondii besmet vlees het beste benaderd.
-Met het verkregen T. gondii positief vlees nagaan welke concentraties van zout en andere toevoegingen T. gondii inactiveren.
-Vergelijken van de T. gondii inactivatie met de testmethode in muizen en met de celkweekmethode.

Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

Zolang consumenten deze rauwe vleeswaren consumeren is er noodzaak om, naast voorlichting over de risico's, voedsel te produceren dat zo veilig mogelijk is. De hoge humane ziektelast van T. gondii maakt het noodzakelijk dat er maatregelen worden genomen om T. gondii infecties in mensen te voorkomen.

Op dit moment zijn er in de vleessector twee bewegingen gaande die het risico op T. gondii in rauwe vleeswaren mogelijk vergroten. Ten eerste is er naast de huidige veehouderij een beweging gaande richting verduurzaming hiervan en die het naar buiten gaan van landbouwhuisdieren stimuleert. Meer buitenloop betekent echter meer risico op een T. gondii besmetting. T. gondii komt voor in het milieu en bijvoorbeeld in de biologisch varkenshouderij komen meer T. gondii infecties voor dan bij varkens die altijd binnen worden gehouden. Ten tweede wordt ernaar gestreefd minder zout in voedingsmiddelen te gebruiken, terwijl juist zout effectief is bij het afdoden van T. gondii. Om die reden is het belangrijk te bepalen hoeveel zout minimaal nodig is.

De resultaten van dit project zullen verder inzicht geven in de optimale concentratie zout die toegevoegd moeten worden om veilige rauwe vleeswaren te produceren. Daarnaast beogen wij dat een potentieel proefdiervrij alternatief voor het aantonen van levende T. gondii in besmet vlees getest kan worden zodat deze de traditionele dierexperimenten voor dit doel kunnen vervangen. Op deze wijze kan er zonder het gebruik van proefdieren het effect van zout en andere toevoegingen op de levensvatbaarheid (of doden) van T. gondii getest worden.

VOORSPELDE SCHADE

In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.

Schape:

- Selectie van een schapebedrijf waar geen T. gondii infecties voorkomen door uitvragen van de abortushistorie, vaststellen of er T. gondii vaccinatie wordt toegepast, afwezigheid van (jonge) katten en geen antilichamen tegen T. gondii in bloed van 10 schape van dit bedrijf. Van 10 schape zal bloed worden afgenomen om vast te stellen of ze ooit een T. gondii infectie hebben doorgemaakt. Alleen wanneer alle 10 schape negatief getest worden dan kunnen deze schape gebruikt worden voor dit project. De afname duurt maximaal 5 minuten.
- 5 geteste schape worden experimenteel besmet met T. gondii door middel van een toediening via de mond. De toediening duurt maximaal 5 minuten
- Bij de 5 schape wordt gedurende 20 weken maximaal 8 keer bloed afgenomen. Een afname duurt maximaal 5 minuten.
- Bij de 5 schape wordt gedurende de eerste 2 weken maximaal 7 keer temperatuur gemeten. Een meting duurt maximaal 5 minuten.
- Schape worden aan het einde van het experiment verdoofd en daarna gedood in een steriele sectieruimte om het geïnfecteerde vlees te verkrijgen. Het onder verdoving brengen duurt maximaal 5 minuten.

Muizen:

- Het experiment start met een eenmalige bloedafname van alle dieren. De afname duurt maximaal 1 minuut.
- Daarna wordt via een injectie in de buikholte T. gondii besmet weefsel toegediend (verkregen uit het schapeexperiment). Deze handeling duurt maximaal 1 minuut.
- Dieren worden 42 dagen lang één tot drie keer per dag beoordeeld op klinische symptomen van de besmetting. Deze observaties worden gedaan door de muizen in hun kooi te bekijken. In enkele gevallen worden muizen uit de kooi genomen om ze beter te kunnen bekijken. Deze handeling duurt maximaal 1 minuut.
- Op dag 42, of eerder als de muizen te ziek zijn geworden van de infectie, worden de muizen verdoofd en daarna gedood. Hersenen worden verzameld om te onderzoeken op T. gondii. Mochten de muizen doodgaan in de eerste twee weken, dan wordt ook nog het buikvocht verzameld en onderzocht op T. gondii. Het aantonen van T. gondii in de hersenen of buikvocht duidt op de aanwezigheid van levende en daarom infectieuze T. gondii.

Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?

Zowel de schape als de muizen zullen licht ongerief ondervinden van de handelingen die hierboven zijn beschreven.

De verwachting is dat de schape niet of amper ziek zullen worden na de orale T. gondii infectie. Desondanks worden de dieren dagelijks geobserveerd op mogelijke klinische symptomen zoals ademhalingsproblemen. Als de dieren koorts hebben dan zullen ze koortswerend middel krijgen om het ongerief te verlichten.

Een deel van de muizen kunnen in de eerste drie dagen na de toediening van T. gondii weefsel een buikvliesontsteking ontwikkelen als gevolg van een bacteriële infectie afkomstig uit het toegediende weefsel. Muizen kunnen daarnaast tot ± 2 weken na de toediening van T. gondii weefsel ziek worden als gevolg van deze infectie met als belangrijkste verschijnselen koorts, algehele malaise en vocht in de buikholte. Door de muizen in die periode zeer intensief te observeren met behulp van een experiment-specifieke-klinische-scoringsmethode worden te zieke dieren vroegtijdig uit het experiment genomen en gedood. Dieren krijgen de eerste dagen na infectie drinkwater met pijnstilling om het ongerief van de infectie te verminderen.

Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?

Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad			
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig
Schape (<i>Ovis aries</i>)	10	0	0	10	0
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	143	0	0	130	13

Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?

Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren		
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd
Schapen (<i>Ovis aries</i>)	0	5	0

Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.

5 schapen zullen worden gedood om *T. gondii* besmet vlees te verkrijgen
 143 muizen zullen gedood worden om in hersenen en in sommige gevallen in het buikvocht vast te stellen of de muis een *T. gondii* infectie heeft doorgemaakt.

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

Schape: Schape zijn nodig om geïnfecteerd vlees te verkrijgen voor de experimenten en kunnen niet worden vervangen. In de laatste sectie van de NTS (keuze van de diersoort) wordt dit uitgelegd.

Muizen: Een belangrijk deel van dit project is het vervangen van de muizen experimenten om levende T. gondii aan te tonen in vlees.

In het vorige project is een celweek ontwikkeld die na optimalisatie de muizen experimenten zou kunnen vervangen. Om dit vast te stellen zullen de muizenexperimenten en de celweek eerst met elkaar vergeleken moeten worden. Dit is één van de doelstellingen van dit project. Als de T. gondii detectie met de celweek vergelijkbare resultaten oplevert als de uitkomsten uit de muizenexperimenten dan kan de celweek als proefdiervrij alternatief dienen voor toekomstige projecten met T. gondii.

2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Schape: De eerste stap is om vast te stellen of het schape infectiemodel werkt. Hiervoor worden twee schape gebruikt. Als dit niet blijkt te werken dan zullen wij de geplande experimenten met de overige drie schape niet uitvoeren. Door deze strategie worden zo min mogelijk schape gebruikt.

Muizen: Op basis van de resultaten van onze vorige studie was het mogelijk om een betere berekening te maken van het benodigde aantal muizen voor dit experiment. Doordat zowel de resultaten uit de celweek als de resultaten uit de muisproef worden gebruikt om het effect van zout te bepalen zijn minder bepalingen met de muisproef nodig.

3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

Schape: Er mogen geen T. gondii infecties zijn op het bedrijf waar de schape aanvankelijk gehuisvest zijn. Om vast te stellen welke schape geschikt zijn voor dit project zullen we één bloedafname doen die plaatsvindt op de boerderij waar de dieren gehuisvest zijn. Wanneer alle schape negatief getest worden op T. gondii, dan is het bedrijf geschikt en kunnen de geteste schape gebruikt worden. Schape, afkomstig van een bedrijf dat niet geschikt is zullen niet onnodig worden vervoerd en blootgesteld aan andere experimentele handelingen.

Muizen: Bij de muizenexperimenten hebben we in onze vorige studie gezien dat muizen tot en met de eerste twee weken snel ziek kunnen worden. We hebben op basis van die ervaring onze experiment-specifieke-klinische-scoringsmethode aangepast. Dit betekent dat we de dieren intensiever monitoren, namelijk van twee naar drie keer per dag gedurende de meest kritische periode (de eerste twee weken). We verwachten dat door deze aanpassingen het humane eindpunt voor zieke muizen nog beter kan worden toegepast.

Zowel bij de muizen als bij de schape zal pijnstilling of een ontstekingsremmend middel worden toegediend om mogelijke ongerief van de infectie te verlichten.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

Schape: In het voorgaande project is getracht geïnfecteerd vlees te verkrijgen door middel van slachthuis materiaal (schape harten). Schape werden geselecteerd omdat bekend is dat de besmettingsgraad van T. gondii bij schape hoog is. Uit dit materiaal was echter niet genoeg besmet vlees met voldoende levende T. gondii parasieten te verkrijgen voor verder onderzoek. Om deze reden worden in dit project 5 schape experimenteel geïnfecteerd. Schape worden gemakkelijk

geïnficeerd met *T. gondii*. Op grond van literatuur is de verwachting dat de concentratie bij deze experimenteel geïnficeerde dieren hoog genoeg zal zijn.

Muizen: In deze studie is het van belang om het effect van zout en andere toevoegingen op de levensvatbaarheid van *T. gondii* te bepalen. Hierbij dient een onderscheid gemaakt te worden tussen levende en dode *T. gondii*. Er is dus een test nodig waarmee levende *T. gondii* kan worden aangetoond. Daar wordt de muis voor gebruikt. Dit is de 'gouden standaard' en de enige internationaal aanvaarde methode voor het bepalen van de aanwezigheid van levende *T. gondii* in vlees.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	30-09-2027
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	ja
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	



Advies aan CCD

B

Datum 26 augustus 2021

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202115002

Instelling:

5.1 lid2h

Onderzoeker:

5.1 lid2e

Project:

Verbetering voedselveiligheid door (1) ontwikkeling en validatie van de celkweek voor aantonen van levende *Toxoplasma gondii* parasieten in vlees als alternatief voor de muisbioassay en (2) bepalen van het effect van zout en andere toevoegingen in rauwe vleeswaren op *T. gondii* hiermee

Aanvraagnummer:

AVD202115002

Betreft:

Nieuwe aanvraag

Categorieën:

Translationeel of toegenast onderzoek

Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's**Proces**

De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager:

- 1) U geeft aan dat vanuit de literatuur bekend is dat 2% zout *T. gondii* afdoedt. Wij begrijpen dat u als een positieve controle een concentratie van 3% zout mee wilt nemen in uw dosistitratie. Het is ons echter niet volledig duidelijk waarom dan ook nog 2,1%; 2,4% en 2,7% moet worden meegenomen. Dit zal volgens recept zijn van een vleeswarenfabricant, maar het is niet duidelijk waarom 4 dose levels boven de 2% gebruikt worden, en wat dit toevoegt aan de resultaten.
- 2) Begrijpen wij het goed dat u in eerdere experimenten met de muis-bioassay ook dosistitratiecurves met zout heeft uitgevoerd. Kunt u aangeven waarom dit nu opnieuw nodig is?
- 3) Het is niet volledig duidelijk of de celkweek en de muis-bioassay gelijktijdig plaatsvinden, en of hier go/no go beslismomenten tussen kunnen worden ingevoegd. Graag dit verhelderen.
- 4) Het is ons niet duidelijk waarom van de geïnfecteerde schapen wekelijks een bloedmonster moet worden afgenomen, als deze dieren enkel gebruikt worden voor de 'productie' van geïnfecteerd vlees. Het lijkt er niet op dat dieren die al voldoende hoge antilichaamtiter hebben eerder zullen worden gedood. Kunt u verhelderen waarom deze meerdere bloedmonsters nodig zijn?
- 5) De schapen worden in eerste instantie bij het bedrijf van herkomst bemonsterd. Indien de schapen bij deze bedrijven niet volgens de

	EU-richtlijn 2010/63 worden gehuisvest, dan zou dit bij vraag C moeten worden benoemd.			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen				
	Schapen (<i>Ovis aries</i>)		10	Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn
3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	IFN gamma -/-	143	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Locatie niet bij instelling

3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen

Citaat: Op een regulier commercieel schapenbedrijf wordt bloed van schapen afgenomen voor screening.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen

Schapen (*Ovis aries*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Geen voorkeur voor geslacht, afhankelijk van beschikbaarheid.

3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay

Muizen (*Mus musculus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	- Niet alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. Hierboven een overzicht. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	---

2 DEC advies

DEC-advies	Citaat C4 (directe en uiteindelijke doelen): (...) De DEC heeft, bij meerderheid van stemmen, vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen de directe en uiteindelijke doelstellingen en dat de directe doelen gerechtvaardigd zijn binnen de context van het onderzoeksveld. Citaat C8 (onderzoeksopzet): Een meerderheid van de DEC is van mening dat, na beantwoording van de eerdere vragen en aanpassing van het
-------------------	---

project, het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. Enkele leden van de DEC hebben hun bedenkingen uitgesproken. Het DEC advies is dan ook geen unaniem advies. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in de ogen van de meerderheid van de DEC-leden leiden tot het behalen van de doelstelling(en) binnen het kader van het project.

Eén lid van de DEC vindt de toepasbaarheid niet duidelijk. Het celkweekstelsel kan straks worden gebruikt om de effectiviteit van andere vleesbewerkingsmethoden te onderzoeken. Het is niet duidelijk of het celkweekstelsel ook breder inzetbaar is in de praktijk: de pathogenese van *T. gondii* is al uitgebreid bestudeerd, en voor routinmatig gebruik is de celkweekmethode niet geschikt zoals de onderzoeker eerder heeft vermeld. .

Een ander DEC-lid weet niet waarom men wil testen met 3% zout als vanuit de literatuur bekend is dat 2% al voldoende is om *T. gondii* te doden. Ga je hier niet onnodig dieren voor inzetten en waarvoor? Wat is de noodzaak voor 2,4, 2,7 en 3%? In de DEC wordt vervolgens opgemerkt dat de concentraties en aantallen groepen nog niet geheel vast staan. De onderzoeker geeft daar echter geen vervolg aan. Men zou verwachten dat er dan go/no go's geformuleerd zouden zijn wanneer men wel of niet gaat testen in muizen, te meer daar de onderzoeker aangeeft dat men de dierproeven zoveel mogelijk wil verminderen.

Een derde DEC-lid kan uit het voorstel niet opmaken of het nu om de ontwikkeling van een diermodel gaat of om een infectie-experiment. Als het doel is: de ontwikkeling van een diermodel is (een diermodel opzetten om onder experimentele omstandigheden voldoende *T. gondii* besmet weefsel te verkrijgen.), vraagt dit DEC-lid zich af of dat doel met de huidige opzet bereikt kan worden. Op basis van de huidige opzet, komt men in de ogen van dit DEC-lid niet tot een diermodel.

Ook is dit DEC-lid van mening dat wanneer de onderzoeker schrijft dat "hartweefsel van schapen onvoldoende geschikt was omdat het aantal weefselcysten te laag was en niet homogeen verdeeld was maar ook dat van schapenharten uit het slachthuis niet bekend is of het geïnfecteerd was met *T. gondii* en hoe hoog de concentratie van bradyzoieten was" dit perspectief biedt. Bloed van schapen kan dan serologisch onderzocht worden en aangezien schapen vaak een paar dagen afhangen in het slachthuis zouden de positief gebleken karkassen alsnog gebruikt kunnen worden. Dit DEC-lid vraagt zich ook af waarom gekozen is voor 20 weken oude lammeren terwijl de meeste klinische verschijnselen bij (drachtige) eersteworpsooien wordt gezien.

Citaat C10 (huisvesting): De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van

richtlijn 2010/63/EU. Echter, bij de muizen ontbreekt of de dieren in groepen of individueel gehuisvest worden. Bij de schapen is niet vermeld dat de dieren in eerste instantie op het bedrijf van herkomst worden bemonsterd.

Citaat C14 (vervanging): De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Er wordt in dit projectvoorstel gepoogd om proefdiergebruik in de toekomst te vervangen door een celkweekmethode ter detectie van levende T. gondii parasieten in rauw vlees of vleesproducten.

Een van de DEC-leden merkt op dat de onderzoekers de muizenassay in het verleden al hebben gebruikt. Waarom er nu (weer?) een dosistitratie uitgevoerd moet worden in de muizen is voor dit DEC-lid onvoldoende duidelijk gemaakt .

In de vergadering is gediscussieerd dat het in het onderzoek niet om numerieke waarden zoals titer gaat maar dat men onder dezelfde omstandigheden een muisbioassay wil vergelijken met een celkweekmethode. Dan is het de vraag waarom je een dosis-titratie zou willen doen. Het is een aantal DEC-leden verder niet duidelijk of er nu wel of niet een gestandaardiseerde muisassay is en of die nu alleen voor het eigen lab is. En hoe is dan de vergelijking met andere labs?

Citaat C16 (verfijning): De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. Mede door het gebruik van HEP's kan het ongerief van de dieren zo veel mogelijk beperkt blijven tot matig. Eerder onderzoek heeft doen besluiten de controlefrequentie te intensiveren in een bepaalde periode. Hoewel niet van invloed op de cumulatieve mate van ongerief vraagt de DEC zich af of er volstaan kan worden met minder bloedafnames bij de schapen aangezien het daar toch enkel gaat om het verkrijgen van positief vlees? De DEC vindt dat dat met minder bloedafnames vastgesteld kan worden. De motivatie om wekelijks bloed af te nemen, ten behoeve van serologisch onderzoek, is niet duidelijk. Wanneer men bijvoorbeeld de duur van het experiment zou willen verkorten, door de dieren te seceren zodra een voldoende hoge antistof titer is bereikt, dan zou de DEC dat kunnen begrijpen, maar dat is in dit project geen optie. In de ogen van de DEC zou dan 1 of 2 keer bloedafname voldoende moeten zijn. Vermindering van de bloedafnamemomenten zou een verfijning kunnen opleveren.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat:

1. De centrale morele vraag van het project is: Weegt het doel, nl. het

pogen vergroten van de voedselveiligheid door beheersing van T. gondii risico's in rauwe vleeswaren door aanpassingen van procesmaatregelen (o.a. het toevoegen van zout) te onderzoeken en zo nodig te optimaliseren en de traditionele muisbioassay pogen te vervangen door een proefdiervrij alternatief, namelijk de celkweek methode, zodat procesmaatregelen voor de bereiding van vleeswaren in het laboratorium getest kunnen worden en dit niet meer hoeft in een dier, op tegen het maximaal matige ongerief (m.u.v. de dieren die dood gaan voor een HEP toegepast kan worden; die ondervinden ernstig ongerief) van maximaal 143 muizen en 10 schapen?

2. De meerderheid van de DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft in haar afweging meegewogen dat, wanneer het project zijn uiteindelijke doel haalt dit een bijdrage kan leveren het verminderen van proefdiergebruik t.b.v. toxoplasma-detectie.

De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade-baten-analyse:

- De onderzoekers hebben een reëel wetenschappelijk belang. Er is sprake van kennis vergaren. De DEC waardeert dit als een belang van beperkte morele waarde.
- De CRO heeft naast bovengenoemd reëel wetenschappelijk belang van beperkte morele waarde ook een economisch voordeel bij dit onderzoek omdat het in opdracht uitgevoerd wordt. De DEC waardeert dit als een belang van beperkte morele waarde.
- De vleeswarenssector heeft er een economisch belang bij dat zij veilige producten, (tegen een zo laag mogelijke kostprijs) kunnen verkopen aan de consument. De meerderheid van de DEC waardeert dit als een reëel belang van beperkte morele waarde.
- De maatschappij/consument heeft een reëel gezondheidsbelang bij de wetenschap dat de vleesproducten die zij eten veilig zijn. De DEC waardeert dit als een belang van reële morele waarde.
- De overheid heeft er een reëel belang bij wanneer zij door regelgeving beleid kan maken dat voedselveiligheid van vleesproducten voor de consument garandeert. De DEC waardeert dit als een belang van reële morele waarde.
- Toekomstige proefdieren kunnen voordeel hebben wanneer er een dierproefvrij alternatief voor de huidige muisbioassay ontwikkeld wordt. De DEC waardeert dit als een reëel belang van grote morele waarde.
- Tot slot zijn de waarden van de proefdieren in dit project in het geding. Zij ervaren grotendeels maximaal matig ongerief en voor ca. 10% ernstig ongerief als gevolg van de handelingen binnen het project. De integriteit van de proefdieren in dit project wordt niet sterker aangetast dan

gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef. De DEC waardeert het belang van de proefdieren als een reëel belang van grote morele waarde.

3. Op basis van bovenstaande overwegingen is de meerderheid van de DEC (7 van de 10 leden) van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar de ontwikkeling en validatie van de celkweek voor aantonen van levende *Toxoplasma gondii* parasieten in vlees als alternatief voor de muisbioassay en het bepalen van het effect van zout en andere toevoegingen in rauwe vleeswaren op *T. gondii* met maximaal matig ongerief voor maximaal 140 dieren en maximaal ernstig ongerief voor maximaal 13 muizen. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging en vermindering van het aantal dieren. De DEC ziet wel mogelijkheden op het terrein van verfijning van de aanvraag.

Twee DEC-leden twijfelen aan de haalbaarheid van de doelstelling om reden zoals onder C.8 beschreven. Eén van deze twee DEC-leden heeft ook twijfels over de te testen procesmaatregelen. Dit DEC-lid is van mening dat al bekend is dat invriezen uiterst effectief is maar nauwelijks ingezet wordt omdat dit economisch niet rendabel is. Dit DEC-lid ziet het als een ethisch probleem dat nieuwe methoden enkel om economische redenen ontwikkeld worden. Eén van deze twee DEC-leden ziet niet als doel het ontwikkelen van een dierproefvrije methode en is van mening dat het hier gaat om het uitvoeren van een infectie-experiment. Een van de DEC-leden geeft aan dat hij niet kan inschatten hoe realistisch het is dat de weefselkweek gevoeliger wordt dan de muisbioassay en om die reden niet goed tot een ethische afweging kan komen.

Voor een ander DEC-lid is het belangrijk dat er duidelijkheid komt over de te testen concentraties. Wanneer hier een bevredigend antwoord op komt kan dit DEC-lid tot een positief advies over gaan.

Samenvattend kan de centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden door 7 leden van de DEC. 3 leden van de DEC beantwoorden de centrale morele vraag op dit moment met "nee".

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

De DEC heeft vragen gesteld over o.a.:

- Waarom de celkweek, die eerder onvoldoende sensitief was, nu wel voldoende sensitief zou kunnen zijn.

- De noodzaak om schapen te infecteren met toxoplasma.

	<ul style="list-style-type: none"> - Onderbouwing waarom toevoegen van parasieten aan vlees waar het niet in zit, niet mogelijk is. - Nadere toelichting welke bredere toepassing van de T. gondii celkweekmethode in de toekomst in de praktijk kan ontstaan, en hoe deze methode/strategie proefdierbesparend is. - Onderbouwing waarom alle 16 inactivatieprocessen ook in de muizen getest moeten worden? - Effect van de toevoeging van zout, natriumacetaat of natriumlactaat effect op de celcultuur. - Verheldering waarom de detectielimiet van de muisbioassay nog moet worden bepaald. - Nadere duiding van het vervolg als de detectielimiet van de celkweekmethode hoger ligt dan die van de muis-assay. - Mogelijkheden vermindering/verfijning/go-no go. - Mogelijkheid gebruik kweekvlees - Onderbouwing range van zoutconcentraties en transleerbaarheid <p>Het DEC advies is Positief</p> <p>Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus. Drie van de tien DEC leden is van mening dat het doel van deze aanvraag niet opweegt tegen het ongerief dat de 143 muizen en 10 schapen wordt aangedaan.</p>
--	--

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>De CCD waardeert het dat u duidelijk het standpunt van de verschillende DEC leden heeft weergegeven, en welke vragen nog leven bij de DEC.</p>	

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling Doelstelling	<p>Citaat:</p> <p>Hoofddoelstellingen</p> <ol style="list-style-type: none">1. Het vergroten van de voedselveiligheid door beheersing van T. gondii risico's in rauwe vleeswaren. Dit doel wordt bereikt door het effect van huidige procesmaatregelen (o.a. het toevoegen van zout) op de bereiding van rauwe vleeswaren te bepalen en zo nodig verder te optimaliseren.2. De traditionele muisbioassay wordt vervangen door een proefdiervrij alternatief, namelijk de celkweek methode, zodat procesmaatregelen voor de bereiding van vleeswaren in het laboratorium getest kunnen worden en dit niet meer hoeft in een dier. <p>Subdoelstellingen</p> <ol style="list-style-type: none">1. Optimaliseren van de celkweek2. Een diermodel opzetten om onder experimentele omstandigheden voldoende T. gondii besmet weefsel te verkrijgen.3. Met het verkregen T. gondii vlees nagaan welke concentraties van zout en andere additieven T. gondii inactiveren en daarmee de vleeswaren veiliger maken. Deze tests worden in eerste instantie uitgevoerd met behulp van de celkweek.4. Confirmatie van de resultaten verkregen met de celkweek (subdoel 3) met de muisbioassay. <p>De muisbioassay is de 'gouden standaard'. De resultaten van afdoding van T. gondii door procesmaatregelen zal getest worden in de celkweek en vergeleken worden met de muisbioassay.</p>
-------------------------------------	---

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat:</p> <ul style="list-style-type: none"> • T. gondii wordt nationaal en internationaal erkend als een belangrijke voedselpathogeen (zie sectie 3.1). De hoge humane ziektelast maakt het noodzakelijk dat er maatregelen worden genomen om T. gondii infecties te voorkomen. • Ook wordt breed erkend dat beheersing van T. gondii risico's van rauw geconsumeerde vleesproducten gewenst is (zie ook sectie 3.1) • Voor de vleeswarenssector is het urgent en belangrijk om te weten of de huidige procesmaatregelen voor de bereiding van rauwe vleeswaren, eventueel met kleine aanpassingen van de receptuur, voldoende zijn om het risico voor de consument te beheersen. • De overheid neemt maatregelen om de veehouderij diervriendelijker en duurzamer te maken. <p>Verduurzamen van de veehouderij betekent waarschijnlijk ruimte voor het natuurlijke gedrag van koeien, varkens en kippen en zorg voor hun specifieke behoeften en daarmee wordt buitenloop gestimuleerd. Meer buitenloop van dieren betekent meer risico op een T. gondii besmetting. T. gondii oöcysten komen voor in het milieu en bijvoorbeeld in de biologische varkenshouderij hebben varkens de mogelijkheid om buiten te lopen. Juist bij deze varkens komen meer T. gondii infecties voor (Kijlstra et al., 2004).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Er is al meerdere jaren extra aandacht voor de hoeveelheid zout in voedingsmiddelen. De Gezondheidsraad beveelt aan om het gebruik in Nederland te beperken ter voorkoming of terugdringing van een hoge bloeddruk en ter vermindering van de kans op hart- en vaatziekten (Gezondheidsraad, 2015). Nederlandse vleeswarenproducenten werken aan het verder terugdringen van de zoutgehalten in hun producten. Dit project is van waarde voor de vleeswarenindustrie omdat duidelijk wordt hoeveel zout er nodig is om T. gondii in rauwe vleeswaren af te doden. De verworven kennis van dit project kan gebruikt worden om onder- of overdosering te voorkomen. • Het risico van T. gondii in rauwe vleeswaren heeft de aandacht van de Nederlandse overheid, deze heeft vragen gesteld aan de vleeswarenssector over de preventie van T. gondii risico's in rauwe vleeswaren. • De ontwikkeling van een in vitro methode als vervanging van de muisbioassay is voorwaardenscheppend voor de hoofddoelstelling, namelijk zorgen dat rauw geconsumeerde vleeswaren veiliger worden. • De evaluatie van procesmaatregelen voor beheersing van T. gondii risico's in rauw gegeten vleeswaren en eventueel het aanpassen hiervan.
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	De doelstelling is helder verwoord.

<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat uit DEC advies C7: De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, mede afgaande op het geschreven projectvoorstel en het al ervaring hebben op dit onderzoeksgebied voldoende is gewaarborgd. Verder is er een breed samenwerkingsverband met de vleeswarenssector en andere belanghebbende instellingen.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twifelen aan de kwaliteit van het onderzoek of de onderzoeksgroep.</p>
---	--

3V's

Vervanging

3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen: Citaat:

Zonder infectie van deze schapen kan het doel van het onderzoek (beheersen T. gondii voedselveiligheidsrisico's) niet bereikt worden.

1. Er is T. gondii besmet vlees nodig voor het uittesten van de verschillende procesmaatregelen en valideren van de celkweek als alternatief voor de muisbioassy. In het eerste project is geprobeerd om de procesmaatregelen uit te voeren met harten van schapen, verkregen in het slachthuis. Dit bleek echter een niet begaanbare weg omdat er onvoldoende positief materiaal werd verkregen (zie paragraaf 3.1 van het project proposal). De verwachting is dat door een experimentele infectie wel voldoende positief materiaal verkregen wordt. In een experimentele studie is de infectiegraad beter te sturen en dat maakt de kans op succes groter.

2. Een mogelijkheid om T. gondii positief vlees te verkrijgen is door het toevoegen van weefselcysten aan gemalen vlees. Echter, dit is een artificiële situatie en om de effectiviteit van de procesmaatregelen te kunnen testen is het gewenst om uit te gaan van vlees van een dier dat met T. gondii geïnfecteerd is omdat dit de werkelijkheid het beste benadert. Verder kunnen weefselcysten die in vlees aanwezig zijn mogelijk anders op de additieven reageren dan vrije weefselcysten die aan gemalen vlees worden toegevoegd. Voor het verkrijgen van weefselcysten is bovendien een dierproef nodig omdat weefselcysten alleen uit levende dieren verkregen kunnen worden.

3. Preventie van T. gondii infecties in dieren door een andere manier van dierhouderij met meer buitenloop van dieren is geen optie, buitenloop heeft eerder een averechts effect op T. gondii infecties in dieren. Vanwege de verspreiding van T. gondii in het milieu is het bijkans onmogelijk dat dieren (waaronder vooral runderen en schapen) die buiten lopen geen infectie met T. gondii oplopen. Preventie van T. gondii infecties in dieren door een strikt hygiëne regime waarbij de dieren niet meer buiten kunnen komen zou de T. gondii risico's verminderen. In de varkenshouderij in Nederland worden de meeste varkens gehouden onder gecontroleerde huisvestingscondities zonder buitenloop. Daardoor zijn de T. gondii risico's op deze bedrijven gemakkelijker te beheersen dan op schapen- en runderbedrijven waar dieren veel buiten zijn en dus geïnfecteerd kunnen raken met T. gondii. Een striktere hygiëne betekent ook dat welzijn van dieren daardoor in gedrang komt.

	<p>3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay: Citaat: Zonder de muisbioassay kan op dit moment het doel van het onderzoek (beheersen T. gondii voedselveiligheidsrisico's van rauwe vleeswaren) niet bereikt worden:</p> <ol style="list-style-type: none">1. De muisbioassay is de enige test waarmee levende T. gondii parasieten kunnen worden aangetoond in vlees. In dit project wordt de celkweek als alternatief voor de muisbioassay ontwikkeld en gevalideerd. Dit betekent dat de celkweek en de muisbioassay met elkaar worden vergeleken.2. Om de muisbioassay te kunnen vervangen wordt in dit project de celkweek ontwikkeld en gevalideerd. De resultaten van de celkweek worden ook al binnen dit project gebruikt en daarmee draagt de celkweek al bij aan het verkrijgen van resultaten.
--	---

Verminderen	
	<p>3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen: Citaat:</p> <p>1. Het geïnfecteerde schapenvlees wordt gebruikt voor twee doelstellingen: 1) vervangen van de muisbioassay door een in vitro alternatief en 2) om de huidige procesmaatregelen voor de bereiding van rauwe vleeswaren te evalueren en indien nodig aan te passen. Op zich zouden beide doelstellingen in twee aparte projecten en los van elkaar uitgevoerd kunnen worden. In dit project opzet worden ze gecombineerd waardoor minder dieren nodig zijn.</p> <p>2. De eerste vraag die beantwoord zal worden in dit project is of er met een experimentele infectie van schapen voldoende T. gondii positief vlees verkregen kan worden om de procesmaatregelen te testen. Bij het eerste project werden harten van schapen uit het slachthuis gebruikt. Het bleek dat de concentratie van T. gondii parasieten in deze harten te laag was om de procesmaatregelen te testen. Dit is dus een kritisch onderdeel van het project en daarom is als subdoel 2 opgenomen of er voldoende T. gondii parasieten in het vlees aanwezig zijn en of het challenge model leidt tot het verkrijgen van voldoende T. gondii geïnfecteerd vlees. Wanneer het antwoord op deze vragen 'ja' is dan worden pas de volgende schapen geïnfecteerd met T. gondii.</p>
	<p>3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay: Citaat:</p> <p>1. In dit project wordt de celkweek ontwikkeld om de voedselveiligheid van rauwe vleeswaren te onderzoeken. Via wetenschappelijke publicaties, lezingen en workshops zullen de resultaten breder onder de aandacht gebracht worden zodat de muisbioassay niet onnodig gebruikt wordt. Dit zal bijdragen aan de reductie van muizen voor deze toepassing. Er zouden mogelijk andere alternatieven kunnen ontstaan op basis van de verkregen resultaten bijv celkweek voor andere detecties binnen het T. gondii onderzoek en die nog met muizen gebeuren.</p> <p>2. De resultaten van de celkweek worden ook al binnen het project gebruikt waardoor minder herhalingen in de muisbioassay nodig zijn.</p> <p>3. In dit project worden IFNg knockout muizen gebruikt. Deze dieren raken makkelijker geïnfecteerd, waardoor de test gevoeliger is. Met Swiss Webster zouden mogelijk meer muizen per digest nodig zijn om er zeker te zijn dat er geen levende T. gondii aanwezig is.</p>

Verfijnen	
	<p>3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen: Citaat:</p> <p>1. Bij de keuze van het aantal schapen is er op gelet om te voorkomen dat de schapen solitair worden gehuisvest. Dus dat er minimaal twee dieren bij elkaar lopen.</p> <p>2. Er zijn weinig klinische symptomen te verwachten en bij koorts worden NSAIDs gebruikt.</p>
	<p>3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay: Citaat:</p> <p>1. Muizen zijn een goede diersoort gebleken voor een T. gondii infectie. Muizen zijn gevoelig voor T. gondii infecties. In de natuur worden ze ook gemakkelijk geïnfecteerd met T. gondii en als prooi voor de katten is de parasitaire cirkel rond.</p> <p>2. Vanuit literatuur is bekend dat buprenorphine hydrochloride gemengd met het drinkwater de pijn en ongerief van een T. gondii infectie verminderen. Om die reden wordt buprenorphine hydrochloride via het drinkwater aangeboden.</p> <p>3. Humane eindpunten zijn gedefinieerd om het ongerief zoveel mogelijk te beperken. Ervaring met het uitvoeren van de muisbioassay leert dat voor 9% van de muizen het ongerief ernstig was (muizen dood gevonden). Door intensivering van de klinische monitoring (van twee naar drie keer per dag) op de HEPs is het de verwachting dat dit aantal sterk gereduceerd wordt.</p> <p>4. De procesmaatregelen waarvoor uit de celkweek blijkt dat ze weinig effect hebben op de overleving van T. gondii vervallen of worden vervangen.</p>
3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen: Voldoende beschreven.	
3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay: Voldoende beschreven.	

Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.3.1 Toxoplasma gondii infectie van schapen	HEP: <1%	<p>Citaat:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Twee dagen 41°C en reageert niet op een koortsremmend middel. <p>OF</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eet en drinkt niet en is sloom. Is, ondanks eventuele toediening van medicatie, gedurende 24 uur niet in staat om zelfstandig naar de eet- of drinkbak te gaan. <p>OF</p> <ul style="list-style-type: none"> • Normale ademhalingsfrequentie voor schapen is 20 à 30 per minuut. Het HEP wordt bereikt als de ademhalingsfrequentie is drie keer zo hoog (80 à 90 per minuut) gedurende 24 uur.
Schapen (<i>Ovis aries</i>)	Ongerief: 100,0% Matig	
3.4.3.2 Toxoplasma gondii detectie met de muisbioassay	HEP: incidentie 69 (60+5+4) van de 102 (68%) is	<p>Citaat:</p> <ul style="list-style-type: none"> • HEPs worden toegepast als het ongerief van een individuele muis de in dit project beschreven bovengrens overschrijdt. • De muizen worden geëthanaseerd ter voorkoming van uitzichtloos of ernstig lijden. Een coderingslijst voor HEPs wordt gebruikt zoals gebruikt in het vorige project (AVD5.1 lid2h) en voor het Toxoplasma EFSA project in 2015 en beschreven in het EFSA rapport van Opsteegh et al., 2016 (www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/995e). <p>In de bijlage dierproeven is onder vraag E een tabel toegevoegd met scores voor conditie vacht, en houding/gedrag, en maximale scores waarbij een HEP wordt bereikt.</p> <p>Citaat: Alle muizen worden één tot drie keer per dag klinisch beoordeeld afhankelijk van de fase van het experiment.</p>
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	Ongerief: 9,0% Ernstig 91,0% Matig	

5 Samenvatting

5.2 lid1

Deze aanvraag is een vervolg op een eerdere vergunning AVD **5.1 lid2h**. De aanvrager heeft onder vraag 3.1 van het projectvoorstel duidelijk weergegeven wat de opbrengsten van dit vorige project waren, en welke vragen nog niet beantwoord zijn. **5.2 lid1, 5.1 lid2h**

Eén DEC lid heeft twijfels bij de toepasbaarheid van het project, met name gericht op de bredere inzetbaarheid van het celkweekstelsel in de praktijk. De DEC heeft hier een vraag over gesteld, het antwoord van de aanvrager was als volgt: "De celkweek kan de muisbioassay vervangen. In het kader van de T. gondii voedselveiligheid van vlees wordt de muisbioassay gebruikt voor: Referentietest voor de validatie van diagnostische testen (PCR, ELISA). Pathogenese en prevalentie studies om na te gaan welke dieren en welke organen van dieren geïnfecteerd zijn met T. gondii. Hierbij wordt soms eerst gebruik gemaakt van serologie of PCR, maar wordt muisbioassay gebruikt om te bepalen of de aanwezigheid van antilichamen of parasitair DNA ook betekent dat er infectieuze T. gondii aanwezig is.

Inactivatiestudies van T. gondii in vlees, zoals de studie die wij willen uitvoeren. In deze studie onderzoeken we het effect van zout, lactaat en acetaat. Echter, hier houdt het onderzoek niet mee op. Er kunnen ook andere toevoegingen (andere conserveringszouten of bijvoorbeeld specerijen en saus) en bewerkingen (drogen, roken, vriezen, verhitten, fermenteren) onderzocht worden met de muisbioassay.

Bij al deze toepassingen kan een celkweek de muisbioassay vervangen. Daarnaast is het mogelijk dat de muisbioassay op kleinere schaal wordt gebruikt omdat de celkweek al een heel aantal antwoorden geeft. In dat geval is er dus een vermindering in plaats van een complete vervanging. Bovendien is het mogelijk om met een celkweek meer variaties te onderzoeken dan met een muisbioassay kan gebeuren. Een muisbioassay is altijd beperkend in het aantal monsters. Afrondend kan gezegd worden dat er veel perspectief is voor de celkweekmethode."

5.2 lid1

Een ander DEC-lid weet niet waarom men wil testen met 3% zout als vanuit de literatuur bekend is dat 2% al voldoende is om T. gondii te doden. Ga je hier niet onnodig dieren voor inzetten en waarvoor? Wat is de noodzaak voor 2,4, 2,7 en 3%?

De aanvrager geeft aan dat bij het opstellen van de 16 procesmaatregelen gebruik is gemaakt van de huidige recepturen van bij het proces betrokken vleeswarenfabrikanten.

5.2 lid1

5.2 lid1

De DEC geeft aan dat: "Men zou verwachten dat er dan go/no go's geformuleerd zouden zijn wanneer men wel of niet gaat testen in muizen, te meer daar de onderzoeker aangeeft dat men de dierproeven zoveel mogelijk wil verminderen."

In antwoord op een vraag van de DEC geeft de aanvrager aan dat "Procesmaatregelen waarvoor uit de celkweek duidelijk is dat niet alle T. gondii wordt afgedood hoeven niet herhaald hoeven te worden in de muisbioassay."

Een derde DEC-lid kan uit het voorstel niet opmaken of het nu om de ontwikkeling van een diermodel gaat of om een infectie-experiment. Als het doel is: de ontwikkeling van een diermodel is (een diermodel opzetten om onder experimentele omstandigheden voldoende T. gondii besmet weefsel te verkrijgen.), vraagt dit DEC-lid zich af of dat doel met de huidige opzet bereikt kan worden. Op basis van de huidige opzet, komt men in de ogen van dit DEC-lid niet tot een diermodel. 5.2 lid1

Ook is dit DEC-lid van mening dat wanneer de onderzoeker schrijft dat "hartweefsel van schapen onvoldoende geschikt was omdat het aantal weefselcysten te laag was en niet homogeen verdeeld was maar ook dat van schapenharten uit het slachthuis niet bekend is of het geïnfecteerd was met T. gondii en hoe hoog de concentratie van bradyzoieten was" dit perspectief biedt. Bloed van schapen kan dan serologisch onderzocht worden en aangezien schapen vaak een paar dagen afhangen in het slachthuis zouden de positief gebleken karkassen alsnog gebruikt kunnen worden.

Het Secretariaat 5.2 lid1

Dit DEC-lid vraagt zich ook af waarom gekozen is voor 20 weken oude lammeren terwijl de meeste klinische verschijnselen bij (drachtige) eersteworpsooien wordt gezien.

Secretariaat: De schapen die worden gebruikt, zijn enkel bedoeld om geïnfecteerd vlees te verkrijgen. 5.2 lid1

Voor één van de DEC leden is het onvoldoende duidelijk waarom er nu weer een dosistitratie moet worden uitgevoerd in de muizen. Deze vraag is gesteld aan de aanvrager.

Het is een aantal DEC-leden verder niet duidelijk of er nu wel of niet een gestandaardiseerde muisassay is en of die nu alleen voor het eigen lab is. En hoe is dan de vergelijking met andere labs?

De aanvrager geeft aan dat de muisbioassay een internationaal aanvaarde gouden standaard is voor het bepalen van de aanwezigheid van levend T. gondii.

De DEC vraagt zich af of er volstaan kan worden met minder bloedafnames bij de schapen, aangezien het daar toch enkel gaat om het verkrijgen van positief vlees. 5.2 lid1

De DEC geeft aan dat bij de muizen ontbreekt of de dieren in groepen of individueel gehuisvest worden. Aangezien de aanvrager aangeeft dat volgens de eisen in de richtlijn wordt gehuisvest, gaat het Secretariaat ervan uit dat het groepshuisvesting betreft.

De schapen worden in eerste instantie bemonsterd op het bedrijf van herkomst. Dit voorkomt onnodig transport van dieren die positief blijken te zijn. 5.2 lid1

5.2 lid1

5.2 lid1

5.2 lid1

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk september 2027 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
08007890789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD 5.1 lid2h 202115002
Bijlagen
3

Datum 26 augustus 2021

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 5.1 lid2e ,

Op 10 juni 2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Verbetering voedselveiligheid door (1) ontwikkeling en validatie van de celkweek voor aantonen van levende *Toxoplasma gondii* parasieten in vlees als alternatief voor de muisbioassay en (2) bepalen van het effect van zout en andere toevoegingen in rauwe vleeswaren op *T. gondii* hiermee" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202115002. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 1 oktober 2021 tot en met 30 september 2026.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk september 2027 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Datum:
26 augustus 2021
Aanvraagnummer:
AVD 5.1 lid2n 202115002

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie 5.1 lid2n (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 20 juli 2021. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 23 juli 2021 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de strategie en de 3V's. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d en artikel 10a1, derde lid van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk september 2027 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

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 nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

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. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een

spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

5.1 lid2h

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving

Datum:

26 augustus 2021

Aanvraagnummer:

AVD **5.1 lid2h** 202115002



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 oktober 2021 tot en met 30 september 2026, voor het project "Verbetering voedselveiligheid door (1) ontwikkeling en validatie van de celkweek voor aantonen van levende *Toxoplasma gondii* parasieten in vlees als alternatief voor de muisbioassay en (2) bepalen van het effect van zout en andere toevoegingen in rauwe vleeswaren op *T. gondii* hiermee" met aanvraagnummer AVD^{5.1 lid2h} 202115002, na advies van dierexperimentencommissie^{5.1 lid2h}. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 10 juni 2021
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 19 augustus 2021;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1 *Toxoplasma gondii* infectie van schapen, zoals ontvangen op 20 juli 2021;
 - 3.4.3.2 *Toxoplasma gondii* detectie met de muisbioassay, zoals ontvangen op 20 juli 2021;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 19 augustus 2021;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 20 juli 2021
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 19 augustus 2021.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.3.1 <i>Toxoplasma gondii</i> infectie van schapen			
	Schapen (<i>Ovis aries</i>)	10	100,0% Matig
3.4.3.2 <i>Toxoplasma gondii</i> detectie met de muisbioassay			
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / IFN gamma -/-	143	9,0% Ernstig 91,0% Matig

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk september 2027 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Aanvraagnummer: AVD^{5.1 lid2h} 202115002

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD^{5.1 lid2n} 202115002

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 van de wet staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd

Aanvraagnummer:AVD 5.1 lid2f 202115002

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b van de wet moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c van de wet volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d van de wet is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

Locatie

De vergunning wordt verleend voor een project waarbij dierproeven geheel of gedeeltelijk worden verricht buiten een inrichting van een gebruiker (artikel 10g van de wet).

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, eerste lid onder d en derde lid van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld.

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: maandag 13 september 2021 08:45
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: Terugkoppeling over projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 202115002
Categorieën: Dossier: 5.1 lid2e

Geachte 5.1 lid2h,

Op 10-06-2021 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Verbetering voedselveiligheid door (1) ontwikkeling en validatie van de celkweek voor aantonen van levende Toxoplasma gondii parasieten in vlees als alternatief voor de muisbioassay en (2) bepalen van het effect van zout en andere toevoegingen in rauwe vleeswaren op T. gondii hiermee' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202115002.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op de strategie en de 3V's.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 26-8-2021.

De vergunning wordt verleend onder de volgende voorwaarden:

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1 lid 1 sub d en artikel 10a1 lid 3 van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan.

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen. De CCD waardeert het dat u duidelijk het standpunt van de verschillende DEC leden heeft weergegeven, en welke vragen nog leven bij de DEC.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl