Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900 2800028 (10 ct/min)
wob-ccd@rvo.nl

Onze referentie
B.2.16.027

Uw referentie
[redacted]

Briefkenmerk
CCD-2017-127

Bijlage(n)
1

Datum 04 MEI 2017
Betreft Beslissing op bezwaar B.2.16.027 (W16-11S)

Geachte heer [redacted],

Bij brief van 4 oktober 2016, ontvangen op 5 oktober 2016, heeft u, namens uw cliënte mevrouw [redacted], een bezwaarschrift (met kenmerk 2016/153) ingediend tegen het besluit van de Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) van 31 augustus 2016 met kenmerk W16-11S.

Verloop van de procedure
Op 15 april 2016 ontvingen wij per e-mail het verzoek op basis van de Wet openbaarheid van bestuur (hierna: Wob) van uw cliënte om toezending van documenten die betrekking hebben op een vijftal verschillende vergunningen. Voor een opsomming van de vergunningen wordt verwezen naar het verzoek. Bij besluit van 31 augustus 2016 is op dit Wob-verzoek beslist.

Op 13 oktober 2016 hebben wij per brief bevestigd dat wij uw bezwaarschrift hebben ontvangen.

Middels de reactie van 19 oktober 2016 op uw klachtbrief van 5 oktober 2016 is aangegeven dat de documenten op korte termijn op de website van de CCD zouden worden geplaatst. Dit is aldus op 24 oktober 2016 geschied.

Vervolgens is bij brief van 21 november 2016 aan u medegedeeld dat de termijn om te beslissen op het bezwaarschrift met zes weken is verdaagd. In deze brief hebben wij opgenomen in welke situaties de beslistermijn kan worden verlengd.

Op 14 maart 2017 ontvingen wij – via de rechtbank Gelderland – van u een beroepschrift wegens het niet tijdig beslissen op het betreffende bezwaarschrift.

Op 16 maart 2017 hebben wij u verzocht om uw gronden van bezwaar (eventueel) aan te vullen, nu de documenten van het bestreden Wob-besluit W16-11S sinds 24 oktober 2016 op de website van de CCD staan gepubliceerd. Tevens hebben wij ruim voor de datum van de hoorzitting de geanonimiseerde zienswijzen van de derde belanghebbenden toegestuurd. Wij hebben u voor de aanvulling van de gronden een termijn tot 30 maart 2017 verleend. Van deze mogelijkheid heeft u geen gebruik gemaakt.

Voorts heeft op 4 april 2017 de hoorzitting met u plaatsgevonden. Het verslag van de hoorzitting is als bijlage bij dit besluit gevoegd. Tijdens de hoorzitting heeft u een groot aantal nieuwe bezwaargronden aangevoerd. Gesteld wordt dat met het zodanig laat kenbaar maken van nieuwe gronden van bezwaar derde belanghebbenden worden belemmerd om daarop adequaat te reageren, waardoor de goede voortgang van de procedure is belemmerd. Uw handelswijze wekt bovendien op zijn minst de indruk dat deze is bedoeld om de besluitvorming te vertragen, zodat een dwangsom wordt verbeurd, nu u onlangs een beroep niet tijdig beslissen heeft ingediend.

Derde belanghebbenden hebben aangegeven niet gehoord te willen worden in deze zaak.

Beslissing
Het bestuur van de CCD verklaart het bezwaar namens uw cliënte gedeeltelijk gegrond.

Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen het bestuur van de CCD tot deze beslissing is gekomen.

Ten aanzien van de ontvankelijkheid
Het bezwaar richt zich tegen het besluit van 31 augustus 2016. Het bezwaarschrift is ingediend binnen zes weken na bekendmaking van het besluit. Het bezwaar is derhalve tijdig ingediend. Voldaan is ook aan de overige door de Algemene wet bestuursrecht (hierna: Awb) gestelde eisen, zodat het bezwaarschrift ontvankelijk is.

Derde belanghebbenden
De derde belanghebbenden zijn gevraagd om een zienswijze. Deze zienswijzen zijn u voor de hoorzitting, anoniem, verbonden aan het NTS-nummer, verstrekt.

Bezwaren
Hieronder worden uw bezwaargronden kort toegelicht.

Uw bezwaren zien toe op meerdere punten. Allereerst is aangegeven dat de data van vergaderingen van de CCD niet kunnen worden geweigerd op grond van artikel 11 lid 1 van de Wob (hierna: **bezwaar 1**). Voorts maakt u bezwaar tegen het niet kenbaar maken van de weigerings- of uitzonderingsgronden per specifieke passage (hierna: **bezwaar 2**).

Daarnaast heeft u aangegeven dat weigeringen op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob – anders dan namen, locatiegegevens, gegevens die direct

herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen – niet inzichtelijk zijn gemaakt. De zienswijzen van derde belanghebbenden worden genoemd, maar het oordeel van de CCD hierover ontbreekt (hierna: **bezwaar 3**). Tevens maakt u bezwaar tegen het feit dat informatie wordt geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub e van de Wob en dat dit wordt gemotiveerd door te verwijzen naar dierenrechtenactivisme (hierna: **bezwaar 4**).

Tijdens de hoorzitting heeft u aanvullend nog aangegeven dat in vergunning 2016405 veel referenties zijn geweigerd, maar dat u bestrijdt dat alle verwijzingen herleidbaar zijn tot bij deze vergunning betrokken personen. Deze bezwaargrond zal tezamen met bezwaargrond 3 worden behandeld.

Tenslotte wordt door u verzocht om heroverweging van het besluit en om alsnog alle openbare informatie te verstrekken. Tevens wordt verzocht om toepassing te geven aan artikel 7:15 Awb.

Ten aanzien van bezwaar 1
U heeft aangegeven dat data van vergaderingen ten onrechte zijn geweigerd op grond van artikel 11 lid 1 van de Wob. Dergelijke data van vergaderingen zijn geen persoonlijke beleidsopvattingen. Ook de verwachting dat kort voor de vergaderingen een piek zal optreden in het aantal vergunningaanvragen is geen persoonlijke beleidsopvatting.

Tijdens de hoorzitting op 4 april 2017 heeft u aangegeven dat het onderhavige Wob-verzoek ziet op de correspondentie tussen de DEC's en de CCD en de aanvragers en de CCD. Hiermee heeft u het Wob-verzoek ingeperkt, waardoor de bovenstaande bezwaargrond komt te vervallen.

Aanvullend kunnen wij aangeven dat de data van vergaderingen onderdeel uitmaken van het advies van het secretariaat van de CCD aan het bestuur van de CCD. Het complete document is geweigerd op grond van artikel 11 lid 1 van de Wob. Data van vergaderingen van de CCD kunnen echter niet worden gezien als persoonlijke beleidsopvattingen ten behoeve van intern beraad. De data van vergaderingen worden middels dit besluit alsnog niet geopenbaard, omdat de data reeds openbaar zijn middels de verslagen van de vergaderingen van de CCD. Deze verslagen zijn eenvoudig te vinden op de website van de CCD, via (onder andere) de zoekterm 'verslag'.

Op basis van het vorenstaande slaagt deze grond.

Ten aanzien van bezwaar 2
Bij het besluit zijn per vergunning kruisjestabellen toegevoegd. In deze tabellen staan de aangetroffen documenten naar aanleiding van het Wob verzoek. De documenten zijn genummerd en per document is opgenomen welke, indien van toepassing, weigeringsgrond(en) zijn toegepast.

Uit vaste jurisprudentie volgt dat op deze wijze voldoende inzichtelijk is gemaakt op welke grond(en) informatie wordt geweigerd. Verwezen wordt naar onder meer de uitspraak van de rechtbank Amsterdam van 29 december 2016, ECLI:NL:RBAMS:2016:9336.

Voor wat betreft de weggelakte persoonsgegevens kan gelet op onder meer de opbouw en context van de documenten worden opgemaakt om wat voor soort gegevens het gaat. Daaruit kan worden afgeleid dat de persoonsgegevens en de hiertoe herleidbare informatie zijn geweigerd op grond van artikel 10, tweede lid, aanhef en onder e van de Wob. In het besluit is tevens opgenomen in welke gevallen informatie is geweigerd op grond van het voorkomen van onevenredige benadeling. Dit sluit aan bij de informatie zoals opgenomen in de kruisjestabel. Uit de kruisjestabel en uit het besluit volgt dat het advies van het secretariaat van de CCD aan het bestuur van de CCD volledig is geweigerd op grond van artikel 11 van de Wob.

Bij enkele in het besluit genoemde documenten is informatie geweigerd op alleen de weigeringsgrond onevenredige benadeling. Ook dit volgt uit het besluit.

Het is dus zonder meer duidelijk op basis van welke uitzonderingsgrond is geweigerd een bepaalde passage of zinsnede openbaar te maken.

De openbaar gemaakte documenten zijn bovendien bij iedere vergunning nagenoeg vergelijkbaar. Meerdere documenten betreffen formulieren of zijn opgemaakt in een vaste opbouw, zodat het per document motiveren van de weigeringsgrond zou leiden tot herhaling, hetgeen geen doel dient. Dit geldt ook in het geval het niet gaat om geheel gelijksoortige documenten. Verwezen wordt naar rechtsoverweging 3.2 van de uitspraak van de Afdeling bestuursrechtspraak van de Raad van State van 2 september 2015, ECLI:NL:RVS:2015:2779.

Op basis van het vorenstaande slaagt deze grond niet.

Ten aanzien van bezwaar 3
In uw bezwaarschrift heeft u aangegeven dat weigeringen op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob – anders dan namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen – niet inzichtelijk zijn gemaakt. Aangegeven wordt wat derde belanghebbenden in hun zienswijzen hebben gesteld, maar hierop wordt door de CCD niet beslist.

Tijdens de hoorzitting heeft u voorts aangegeven dat in vergunning 2016405 veel referenties zijn geweigerd, maar dat u bestrijdt dat alle verwijzingen herleidbaar zijn tot bij deze vergunning betrokken personen. Wanneer referenties naar onderzoekers die ook betrokken zijn bij dit onderzoek zijn geweigerd, kunt u zich daar in vinden. Voor het overige heeft u met betrekking tot dit besluit geen nadere gronden aangevoerd.

Uit het bestreden besluit volgt dat geen informatie is geweigerd op grond van het zijn van concurrentiegevoelige informatie (onder het kopje 'het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling').

In de vergunningen 2015329, 2015330, 2015331 en 2015336 is weliswaar informatie geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob, maar zoals uit zowel het bestreden besluit als de documenten volgt, gaat het hier slechts om namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen. Deze informatie wordt geweigerd op basis van de in

het primaire besluit en in dit besluit eerder opgenomen gronden van eerbiedging van de persoonlijke levenssfeer en het voorkomen van onevenredige benadeling.

In de inventaris behorend bij vergunning 2016405 (ten onrechte staat in de inventaris zelf 2015331 opgenomen, dit dient echter 2016405 te zijn) staat dat – onder andere – in de documenten 2, 4, 5, 6, 7 en 8 informatie is geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob. Het betreft hier publicaties die eenvoudig naar de betrokken onderzoekers leiden en namen van afdelingen die direct naar de betrokken onderzoekers leiden.

In het bestreden besluit is de zienswijze van de betrokken derde belanghebbende over deze informatie opgenomen onder 'herleidbaarheid'. Een oordeel van de CCD is hierover echter niet opgenomen. Middels dit besluit verduidelijkt de CCD dat het slechts een viertal referenties betreft, afkomstig van onderzoekers die ook bij het onderhavige onderzoek betrokken zijn. Deze referenties worden in de hiervoor genoemde stukken telkens herhaald.

Tijdens de hoorzitting heeft u aangegeven dat u zich kunt vinden in het weigeren van referenties naar onderzoekers die ook zijn betrokken bij het huidige onderzoek. Het gaat hier tevens om ongepubliceerd werk, waarvan de CCD het van belang acht, dat dit werk niet middels het Wob-besluit dan wel de beslissing op bezwaar reeds in deze fase van het onderzoek wordt geopenbaard. In de documenten zal worden verduidelijkt wanneer het gaat om referenties naar nog niet gepubliceerd werk. De woorden 'unpublished results and personal communication' zullen middels dit besluit in document 5 worden geopenbaard. Namen van afdelingen worden in deze betreffende documenten niet genoemd en zijn derhalve ook niet geweigerd.

Op basis van het voorgaande slaagt deze grond gedeeltelijk.

Ten aanzien van bezwaar 4
In uw bezwaarschrift stelt u dat met de weigering op grond van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer (artikel 10 lid 2 sub e van de Wob), vanwege dreiging van dierenrechtenactivisme, wordt voorbij gegaan aan het jaarverslag van de AIVD over 2015, waarin staat dat dierenrechtenextremisme een teruglopend fenomeen is en dat het nu alleen nog vreedzame acties en demonstraties betreft. U stelt dat de CCD dit niet kan beoordelen en verzoekt de gegevens alsnog openbaar te maken.

In tegenstelling tot deze bezwaargrond is bij de behandeling van het bestreden besluit uitgegaan van het op dat moment beschikbare meest recente AIVD jaarverslag en DTN van de NCTV. In het bezwaarschrift verwijst u slechts naar de voorgaande versies.

In de memorie van toelichting bij de Wet op de Dierproeven (Tweede Kamer, vergaderjaar 2012–2013, 33 692, nr. 3) wordt benadrukt dat ook tot personen herleidbare gegevens onder de weigeringsgrond eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer kunnen vallen. In de memorie van toelichting is aangehaald dat: *"het belang van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer zwaar moet wegen."*

Daarbij speelt een rol dat personen die betrokken zijn bij het verrichten van dierproeven een maatschappelijke taak uitoefenen en het risico lopen slachtoffer te worden van dierenrechtenactivisme[1]. In het recente verleden zijn daar veel voorbeelden van geweest. Uit vaste rechtspraak volgt dat, dat ook bij de Wob een terugkerend onderwerp is.

Binnen de context van de opgevraagde documenten bestaat de vrees voor gevaar voor de persoonlijke levenssfeer en dat personen betrokken bij dierproeven als gevolg van openbaarmaking van hun gegevens overmatig en mogelijkerwijs ook gewelddadig zullen worden benaderd door dierenrechtenactivisten. De incidenten die zich in het verleden hebben voorgedaan bevestigen dat een kleine groep mensen een reëel risico kan vormen en dat de vrees voor acties van dierenrechtenactivisten gerechtvaardigd is. Verwezen wordt naar de uitspraak van de rechtbank Midden-Nederland van 8 augustus 2016, zaaknummers UTR 15/3008 en UTR 15/3727. Dat er nog steeds een reële dreiging van radicaal dierenrechtenactivisme uitgaat, blijkt in de eerste plaats uit de uitspraken van de Afdeling bestuursrechtspraak van de Raad van State van 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680) en 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952).

De Afdeling stelt dat het betrokken bestuursorgaan zich in redelijkheid op het standpunt heeft kunnen stellen dat het belang van betrokken derde belanghebbenden om tegen bedreigingen en intimidatie van dierenrechtenactivisten beschermd te blijven en daarmee het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling als bedoeld in artikel 10 lid 2 sub g van de Wob zwaarder dient te wegen dan het publieke belang bij openbaarmaking van de gevraagde gegevens. Uit de uitspraken volgt dat het belang van bescherming van werknemers van vergunninghouders, proefdierinstellingen en andere betrokkenen groot is en in de afweging van belangen zwaarder weegt dan het publieke belang van openbaarmaking van de gevraagde gegevens.

Van belang is verder dat met het openbaar maken van persoonsnamen en tot personen herleidbare gegevens, deze gegevens voor een ieder openbaar zijn en ook openbaar blijven. Dit is benadelend voor de betrokken personen. De CCD zal de namen van personen en alle daar direct of indirect naar herleidbare gegevens blijven weigeren.

De CCD is van oordeel dat de afweging om het wel of niet openbaar maken van persoonsgegevens een geheel andere is dan het weigeren van namen van vergunninghouders. Naar het oordeel van de CCD kan de conclusie van een afweging om informatie met betrekking tot openbaarmaking van bedrijfsnamen van vergunninghouders versus de openbaarmaking van persoonsnamen op basis van een vergelijkbaar feitencomplex van elkaar afwijken. De belangenafweging is van geheel andere aard en kent ook een ander gewicht. De hierboven genoemde overwegingen geven op zijn minst aanleiding een zwaarder gewicht toe te kennen aan de belangen van de eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer.

---

[1] Blz. 14 Memorie van Toelichting Wet op de dierproeven

Het belang van weigering van persoonsgegevens en tot persoonsgegevens herleidbare informatie weegt op grond van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer zwaarder dan het publiek openbaar maken van deze informatie.

Op basis van het vorenstaande slaagt deze grond niet.

Verzoek proceskostenvergoeding
U heeft verzocht om proceskostenvergoeding door toepassing te geven aan artikel 7:15 Awb. Ingevolge artikel 7:15 lid 2 Awb komen de kosten die de belanghebbende in verband met de behandeling van het gemaakte bezwaar heeft moeten maken voor vergoeding in aanmerking, indien sprake is van een herroeping van het besluit, vanwege een aan het bestuursorgaan te wijten onrechtmatigheid. Gelet op artikel 7:15 lid 2 Awb in samenhang met het Besluit proceskosten bestuursrecht heeft u recht op een vergoeding van € 990,- zijnde 1 punt á € 495,- voor het ingediende bezwaarschrift en 1 punt á € 495,- voor de gehouden hoorzitting.

Wijze van openbaarmaking
Aangezien de mogelijkheid bestaat dat belanghebbenden bezwaar hebben tegen de openbaarmaking van de informatie vindt de feitelijke openbaarmaking van de documenten niet eerder plaats, dan vier weken na dagtekening van deze beschikking, conform artikel 6, vijfde lid, van de Wob. Op deze wijze wordt aan deze belanghebbenden de mogelijkheid geboden om te proberen de openbaarmaking tegen te houden.

Dit kan door het indienen van een beroepschrift bij de rechtbank én door daarnaast bij de rechtbank te verzoeken om, bij wijze van voorlopige voorziening, het onderhavige besluit tot openbaarmaking te schorsen. Indien binnen twee weken na dagtekening van dit besluit een verzoek om voorlopige voorziening is gedaan bij de rechtbank, wordt de uitspraak van de voorzieningenrechter afgewacht, voordat tot daadwerkelijke openbaarmaking wordt overgegaan.

Beroep
Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief een beroepschrift indienen. Stuur het beroepschrift naar de rechtbank in uw arrondissement. Voor meer informatie verwijs ik u naar www.rechtspraak.nl.

U kunt ook digitaal beroep instellen bij genoemde rechtbank via http://loket.rechtspraak.nl/bestuursrecht. Daarvoor dient u wel te beschikken over een elektronische handtekening (DigiD). Kijk op de genoemde site voor de precieze voorwaarden.

Tot slot
In deze brief is u uitgelegd wat de reden is voor deze beslissing. Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. of neem telefonisch contact met ons op via 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Hoogachtend,

De Centrale Commissie Dierproeven,

[redacted]

Prof. dr. L. Hellebrekers
Voorzitter

	Inventaris Wob-verzoek W16-11S								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**document**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
	NTS2015329								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4			x					
8	DEC-advies				x		x	x	
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
10	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
11	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
12	Advies CCD		x						x
13	Beschikking en vergunning				x		x	x	

1

Centrale Commissie Dierproeven

30 NOV. 2015

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.

☒ Ja > *Vul uw deelnemernummer in* 10800 – 329
☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]
KvK-nummer	30275924

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	Instantie voor Dierenwelzijn
Postbus	12007
Postcode en plaats	3501AA Utrecht
IBAN	NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[redacted] ☒ Dhr. ☐ Mw.
Functie	[redacted]
Afdeling	[redacted]
Telefoonnummer	[redacted]
E-mailadres	[redacted]

1.5 *(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[redacted] ☐ Dhr. ☐ Mw.
Functie	[redacted]
Afdeling	[redacted]
Telefoonnummer	
E-mailadres	

1.6	*(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.	(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
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
		☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
2.2	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
2.3	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 einddatum van het project?	Startdatum	1 - 1 - 2016
		Einddatum	1 - 1 - 2018
3.2	Wat is de titel van het project?	DNA vaccinatie met nanopartikels	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	DNA vaccinatie met nanopartikels	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	
		Postadres	
		E-mailadres	

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741 Lege

☐ Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
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.

☐ Via een eenmalige incasso

☐ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

☐

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:

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- 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.
- 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	[redacted]
Functie	[redacted]
Plaats	Utrecht
Datum	28-4-2015
Handtekening	[redacted]

[redacted]

2

Format
Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht
1.3	Vul de titel van het project in.	DNA vaccinatie met nanopartikels

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

- X Fundamenteel onderzoek
- X Translationeel of toegepast onderzoek
- ☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- ☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- ☐ Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- ☐ Hoger onderwijs of opleiding
- ☐ Forensisch onderzoek
- ☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

In 2008 is binnen het 3D drugs delivery programma van NanonextNL het project 03D.04 *DNA Vaccination by Polyplex-Tattooing: from bench to clinic* van start gegaan. Daarin werd toegewerkt naar de klinische applicatie van nanopartikels in DNA vaccinatie. Ondanks veelbelovende ex vivo resultaten die verkregen werden bij gebruik van poly(amidoamine) (PAA) polyplexen in tattooing van humane huid, bleek het door diverse omstandigheden lastig te zijn deze resultaten met voldoende voortgang te vertalen naar toepassing in de kliniek[1,2]. De stap van proefdier naar patiënt bleek groter te zijn dan was geanticipeerd. De evaluatie van de vaccinatie resultaten die verkregen zijn in het project, gecombineerd met zeer recente nieuwe inzichten in het immunisatiemechanisme bij polyplex vaccinatie (zie verderop) en het beschikbaar komen van een nieuwe generatie zeer efficiënte PAA nanogelen voor DNA transfectie hebben geleid tot de conclusie dat er nog uitstekende mogelijkheden zijn om de eerder tegengekomen obstakels bij translatie van DNA vaccinatie via een nieuwe vaccinatie benadering en met behulp van de nieuwe PAA nanogelen te overwinnen. In de doorstart van het project worden op basis van bovenstaande uitgangspunten nieuwe nanopartikels voor DNA vaccinatie ontwikkeld. De doelstelling "from bench to clinic" wordt daarbij dichterbij gehaald door ons in eerste instantie te richten op veterinaire vaccinatie.

DNA vaccinatie

DNA vaccinatie in de huid is een nieuwe vaccinatie methode, waarbij met plasmide DNA (pDNA) cellen van een mens of dier tijdelijk worden getransfecteerd. Hierdoor ontstaat immuniteit tegen het eiwit dat op het pDNA gecodeerd is. Deze methode heeft veel voordelen boven conventionele vaccinatie met eiwit of geïnactiveerd virus : het is eenvoudig, er is geen injectienaald nodig voor de toediening in de huid, het pDNA is extreem lang houdbaar en de opgewekte immuniteit in proefdieren (muizen en apen) is robuust en zowel cellulair (Tcell inductie) als humoraal(antilichaam inductie). Helaas is de methode echter tot op heden niet succesvol in mensen[3,4].

Een van de redenen daarvoor is waarschijnlijk het grote verschil in de huidanatomie tussen proefdieren en mensen. Dit verschil leidt ertoe dat de transfectie-efficiëntie in de mensenhuid lager is dan in muizen. Bovendien kan het eiwit dat geproduceerd wordt in de getransfecteerde keratinocyten vermoedelijk minder goed uit de epidermis naar de lymfknoop komen omdat de nauwelijks behaarde mensenhuid 10x zo dik is als de sterk behaarde huid van muizen en apen. Daarom ligt het voor de hand om de technologie door te ontwikkelen in een proefdier model met een huidanatomie die vergelijkbaar is met mensen[5,6,7]. Het varken biedt die mogelijkheid.

Ref.:

1. Bins AD, van den Berg JH, Oosterhuis K, Haanen JB. Recent advances towards the clinical application of DNA vaccines. Neth J Med. 2013 Apr;71(3):109-17.
2. van den Berg JH, Oosterhuis K, Schumacher TN, Haanen JB, Bins AD. Intradermal vaccination by DNA tattooing. Methods Mol Biol. 2014;1143:131-40. doi: 10.1007/978-1-4939-0410-5_9.
3. Eriksson F1, Tötterman T, Maltais AK, Pisa P, Yachnin J. DNA vaccine coding for the rhesus prostate specific antigen delivered by intradermal electroporation in patients with relapsed prostate cancer. Vaccine. 2013 Aug 20;31(37):3843-8.
4. Staff C, Mozaffari F, Haller BK, Wahren B, Liljefors M.A Phase I safety study of plasmid DNA immunization targeting carcinoembryonic antigen in

colorectal cancer patients. Vaccine. 2011 Sep 9;29(39):6817-22. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.12.063. Epub 2010 Dec 30.
5. Marquet F, Vu Manh TP, Maisonnasse P, Elhmouzi-Younes J, Urien C, Bouguyon E, Jouneau L, Bourge M, Simon G, Ezquerra A, Lecardonnel J, Bonneau M, Dalod M, Schwartz-Cornil I, Bertho N. Pig skin includes dendritic cell subsets transcriptomically related to human CD1a and CD14 dendritic cells presenting different migrating behaviors and T cell activation capacities. J Immunol. 2014 Dec 15;193(12):5883-93.
6. Summerfield A, Meurens F, Ricklin ME, The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. Mol. Immunol. 2015 Jul;66(1):14-21.
7. Ploemen IH, Hirschberg HJ, Kraan H, Zeltner A, van Kuijk S, Lankveld DP, Royals M, Kersten GF, Amorij JP. Minipigs as an animal model for dermal vaccine delivery. Comp Med. 2014 Feb;64(1):50-4.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het hoofddoel van deze experimenten is het optimaliseren van een efficiënt dermaal DNA vaccin tegen HPV m.b.v. van het varken als diermodel. De experimenten zijn gericht op het optimaliseren van de verschillende stappen om uiteindelijk het meest effectieve vaccin incl. adjuvantia te selecteren. Met het varken als model verbetert maar verwachting de extrapolatie naar humaan.
Daarnaast heeft deze ontwikkeling van een dermale DNA vaccinatie methode in varkens commercieel zeer interessante toepassingsmogelijkheden. Virale infectieziekten zoals de varkensgriep zijn een aanhoudend probleem in de veehouderij en hoewel er een aantal vaccins beschikbaar zijn, is er veel ruimte voor verbetering; de bescherming van de huidige influenza vaccins is merendeel klinisch en de huidige vaccins geven geen vermindering van transmissie van veldvirus.
De projectgroep bestaat uit
- Prof Johan Engbertsen, TU Twente en CSO 20Med, verantwoordelijk voor de productie nanogelen
- Dr Sanne Samuels van het Nederlands Kanker Instituut, inhoudsdeskundige tatoeage techniek
- Dr. Adriaan Bins, AMC
- Dr Gemma Kenter, AMC
- Dr. Arie van Nes, Specialist varkensgezondheid.

In het team zijn de verschillende aspecten van dit onderzoeksproject vertegenwoordigd, waardoor het project haalbaar moet zijn.

3.3 Belang

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

Wetenschappelijk belang: Het optimaliseren van de dermale DNA vaccinatie technologie voor toepassing in de menselijke huid, fundamenteel onderzoek, dat maatschappelijk van belang is. Daarnaast wordt als spin off de methode gebruikt om varkens door vaccinatie te beschermen tegen varkensgriep. Omdat de huidige methode van tatoeage is niet geschikt voor praktijkomstandigheden, zal – na gebleken effectiviteit - de toepasbaarheid van het ontwikkelde vaccin verder ontwikkeld dienen te worden.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Fase 0: Het ex-vivo testen van DNA vaccinatie op varkenshuid

Fase 1: Het bepalen van de meest optimale transfectie methode en de meest optimale nanopartikel formulering
Fase 2: Het bepalen van de meest optimale penetration enhancer
Fase 3: Het bepalen van CTL inductie en antilichaam inductie na toevoeging van adjuvantia
Fase 4: The proof of the pudding: Kan de optimale dermale DNA vaccinatie uit fase3 een beschermee immuunrespons induceren bij varkens met influenza als model virus.

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

In de eerste fase wordt met behulp van pDNA dat codeert voor luciferase de optimale transfectie methode en de optimale nanoparticle formulering bepaald voor transfectie van varkenshuid. Dit zijn snelle ex vivo proeven met pDNA dat codeert voor luciferase met een read-out op basis van luminicentie metingen.
In de 2e fase wordt getest of met penetration enhancers de drainage naar de drainerende lymfknoop van het antigeen gecodeerd op het pDNA verbeterd kan worden. De hoeveelheid antigeen die uit de huid naar de lymfknoop draineert, wordt in dit model gemeten met een groen fluorescent model-antigeen, waarbij de drainage efficiëntie wordt uitgelezen door het kwantificeren van groen fluorescente antigeen presenteerde cellen in de lymphknoop. Bij deze proeven worden varkens eenmalig gevaccineerd met de optimale methode uit fase1 en wordt na 3 dagen de lymfknoop geexcideerd voor analyse middels flow-cytometrie .
In de 3e fase worden varkens gevaccineerd met de optimale transfectie methode uit fase1 en de optimale penetratie enhancer uit fase2. Het pDNA codeert voor een preklinisch uitvoerig getest vaccin tegen HPV. In dit experiment wordt het effect van een aantal adjuvantia op de CTL inductie (uitgelezen met ELISPOT) en antilichaam inductie (uitgelezen met ELISA) vergeleken om zo een optimaal transdermaal adjuvans te definiëren. De optimale penetration enhancer en het adjuvans worden hierna als dat fysisch chemisch mogelijk is door 20Med geformuleerd in een slow-release pleister, om de toediening zo eenvoudig mogelijk te maken. Haemagglutinine zal toegevoegd worden om de respons hierop ook te bepalen in het kader van fase 4.
In de 4e fase worden een aantal dieren gevaccineerd met een pDNA dat codeert voor haemagglutinine (voor bescherming met antilichamen) en nucleoproteinen (voor bescherming met Tcellen, omdat dit niet beïnvloed wordt door antigenic drift van het influenza virus) . Door middels DNA vaccinatie tegen deze antigenen te vaccineren wordt bovendien het glycosyleringspatroon van de antigenen in natuurlijke setting exact nagebootst. Hierdoor ontstaat naast cellulaire immuniteit ook optimale humorale immuniteit tegen relevante B cell epitopen. De effectiviteit van het vaccin wordt getest door challenge met een varkensinfluenza virus.

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

Flowchart voor DNA vaccinatie met nanopartikels

Fase 0: Testen van formuleringen van nanopartikels met DNA in varkenshuid. Hiertoe wordt huid van varkens gebruikt die in het kader van ander onderzoek of onderwijs geeuthanaseerd zijn.
Uitkomst: Met de huidige techniek van tatoeëren kunnen nanopartikels met DNA correct ingebracht worden en zichtbaar gemaakt worden.
Fase 1: Bepaling van de optimale transfectie methode en de optimale nanoparticle formulering.
Uitkomst: De formulering met de hoogste luminescentie gaat door.
Fase 2: Bepaling van de optimale penetration enhancer
Uitkomst: Analyse van de lymfeknoop d.m.v. flow cytometrie. De enhancer, die de grootste concentratie van groen fluorescente antigeen presenteerde cellen in de lymfeknoop bewerkstelligt, gaat door.
Fase 3: Bepaling van het optimale transdermale adjuvans wat betreft CTL inductie vergeleken.
Uitkomst: Het adjuvans met de hoogste CTL inductie in combinatie met en goede humorale respons (HA) geeft gaat door.

Fase 4: Vaccinatie van varken met een pDNA dat codeert voor haemagglutinine (HA) en Nucleoproteinen met zowel een positieve als een negatieve controlegroep.
Uitkomstparameters: Inductie cellulaire immuniteit, humorale immuniteit en virusexcretie

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.	
Volgnummer	Type dierproef
1	Fase 1 *optimalisatie van transfectie efficiëntie door middel van polyplexen*
2	Fase 2 *testen van de antigen transfer van de huid naar de lymfknoop*
3	Fase 3 *locale adjuvantia voor optimale CTL inductie*
4	Fase 4 *Antilichaam en CTL inductie tegen varkens griep virus*
5	
6	
7	
8	
9	
10	

4

Bijlage
Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 1 Type dierproef: *optimalisatie van transfectie efficiëntie door middel van polyplexen*

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

We gebruiken per experiment 4 varkens, waarbij de liezen en de oksels getatoeëerd worden met 4 verschillende formuleringen. Dit experiment wordt 4 maal herhaald teneinde de optimale formulering te vinden.

Op dag 1 en 2 wordt de huid geïnspecteerd, om een indicatie te krijgen van de toxiciteit.

Op dag 3 wordt het dier geeuthanaseerd, waarna de getatoeëerde huid wordt geexcideerd en op ijs naar het NKI vervoerd. Daar worden de samples direct ex vivo geincubeerd in medium op 37C, waarna luciferine (het substraat voor luciferase) wordt toegevoegd aan het medium, zodat de luminescentie gemeten kan worden met behulp van de IVIS camera.

Met deze proefopzet worden 4 proeven gedaan, waarbij 3x4=12 polyplexen kunnen worden getest. In elk experiment wordt een controle meegenomen, zodat 3 nieuwe polyplexen per experiment kunnen worden getest.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Onder anaesthesie wordt de huid bij de oksels en de liezen een dier (van 20-30kg) voorbehandeld en getatoeëerd zoals hieronder beschreven. Er wordt voorbehandeld met depilatie creme (VEET) waaraan 2% w/w prilocaine is toegevoegd en 2% w/w lidocaïne voor locaal oppervlakkige anaesthesie effect. Deze crème wordt enkele minuten op de huid gehouden en daarna weggewassen met water.

Hierna wordt een tattoo van enkele cm^2 in beide oksels en beide liezen gezet, met pDNA:polyplex formulering in water. Het pDNA codeert voor luciferase van het vuurvliegje, gecloneerd in de pVAX backbone. Deze plasmide backbone wordt toegepast in humane trials en is zeer veilig gebleken. Er is geen risico op replicatie. Het bevat een kanamycine resistentiegen, een oriP, de CMV IE promoter en een BGH polyA tail.

Voor dit experiment wordt het pDNA geformuleerd in polyplexen. Hierdoor verandert de lading en wordt de opname door keratinocyten efficiënter. Dit leidt uiteindelijk tot efficiëntere transfectie en daardoor een hogere luciferase productie. Er worden 4 formuleringen getest in quadriplo. Hiervoor worden dus in totaal 16 tattoos gezet. Elk van de 4 dieren krijgt van elke formulering 1 tattoo. Elk dier krijgt op dag 0 in 1 sessie dus 4 tattoos: in de linker en rechter oksel, en in de linker en rechter lies. De behandelduur per dier voor de voorbehandeling en het zetten van de tattoos is ongeveer een half uur.

Op dag 1 en 2 wordt de huid geïnspecteerd, om een indicatie te krijgen van de toxiciteit. Er wordt geen toxiciteit verwacht, op basis van fase1 trial data in mensen.

Op dag 3 wordt het dier geeuthanaseerd, waarna de getatoeëerde huid wordt geexcideerd en op ijs naar het NKI vervoerd. Daar worden de samples direct ex vivo geincubeerd in medium op 37C, waarna luciferine (het substraat voor luciferase) wordt toegevoegd aan het medium, zodat de luminescentie gemeten kan worden met behulp van de IVIS camera.
Met deze proefopzet worden 4 proeven gedaan, waarbij 3x4=12 polyplexen kunnen worden getest. In elk experiment wordt een controle meegenomen, zodat 3 nieuwe polyplexen per experiment kunnen worden getest.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Per dier worden 4 formuleringen getest, de 4 formuleringen worden bij elk varken op een andere locatie getest, zodat we geen invloed van de locatie op het dier hebben.
Het aantal fotonen wordt gemeten met de IVIS camera. We verwachten dat varkens op eenzelfde manier zullen reageren als muizen. Bij een imaging tijd van 30" en een tattoo van 45s in muizen is de sigma hiervan ongeveer 10000 fotonen. Bij een sample size van 4 wordt de standard error of the mean 10000/wortel 4 = 5000.
Hiermee kunnen we verschillen van 10150 fotonen met een power van 95% aantonen. Een kleiner verschil is niet interessant.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Varkens, afkomstig van een erkende leverancier (De Tolakker), 16 dieren van 20-30 kg (9-10 weken oud), geslacht niet van belang

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

x Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☐ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

We proberen tijdens de eerste fasen van de proeven een aantal variabelen uit opdat we in de laatste fase met het optimale product de challenge doen. Daardoor worden minder dieren gebruikt dan wanneer voor iedere formulering een fase 4 experiment gedaan wordt. Er zijn reeds ervaringen in muizen doch dit diermodel is niet voldoende voorspellend voor de mens. Daarnaast hebben we in fase 0 de techniek reeds geoptimaliseerd op de huid van in ander kader gedode varkens. Daarnaast proberen we om de invloed van lokalisatie op het dier te kwantificeren en dus ook te minimaliseren door 4 monsters op een dier te testen en elk monster op de verschillende lokalisaties op het dier. Verder is uiteindelijk het varken ook doeldier.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

We gebruiken algehele en lokale anaesthesie bij het tatoeëren bij de toepassing van VEET wordt ook een lokaal anaestheticum gebruikt.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

nvt

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

X Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

x Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

x Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

x Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

De dieren worden onder lokale analgesie getatoeëerd. Na de tatoeage wordt ingeschat aan de hand van humane ervaringen dat pijnbestrijding niet noodzakelijk is, De dieren worden gesedeerd alvorens ze met een overdosis barbituraat geeuthanaseerd worden

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

x Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Humaan eindpunt

Een dierproef brengt met zich mee dat dieren tijdens het experiment onaanvaardbaar lijden en dat ze geëuthanaseerd dienen te worden, het zgn. humaan eindpunt. In deze bijlage zijn de criteria voor het humane eindpunt geformuleerd.

Gehanteerde criteria ten aanzien van dierwelzijn en humaan eindpunt

- Een van de belangrijke doelen voor het experiment is de follow-up van de dieren. Medicatie kan het ziekteverloop en de uitkomst van het experiment beïnvloeden en vanuit dit oogpunt wordt daar terughoudend mee omgegaan. Wanneer er naar het oordeel van de verantwoordelijke dierenarts pijnstilling nodig is en dit niet strijdig is met de doelstelling van het experiment, wordt dit echter altijd toegediend.
- Humaan eindpunt: wanneer het lijden van een dier niet langer opweegt tegen het nut dat dit dier voor het onderzoek heeft, wordt het dier eerder geëuthanaseerd.
- Indien het dier een ernstige mate van ongerief heeft, wordt deze geëuthanaseerd.

Criteria:
Doel van het formuleren van deze criteria is het nauwkeurig vastleggen van het “vroegste” eindpunt.
De volgende criteria worden gehanteerd:

1. Algemene criteria:
   a. Het ‘Analogieprincipe’
   b. Het voorkomen van spontaan dood gaan/ernstige pijn
   c. Het minimaliseren van de duur van ongerief

2. Specifieke criteria (mede op basis van het uitgevoerde klinisch onderzoek, observaties, verslaglegging & monitoring):
   De varkens krijgen, indien er verschijnselen van pijn waargenomen worden, adequate pijnstilling toegediend. Een varken heeft een drive om te eten en drinken, derhalve is het belangrijkste criterium om varkens te euthanaseren:
   - niet meer eten en/of drinken: Als een varken stopt met eten en drinken, dan is het varken lijdende.
   - sterk vermageren (in de tijd; monitoring BCS/± 20% verlies in 2 dagen)
   - duidelijke pijngeluiden (tandenknarsen, kreunen)
   - sterk verhoogde pols en ademhaling t.g.v. hevige benauwdheid
   - wanneer het niet mogelijk blijkt de verschijnselen van pijn d.m.v. pijnstilling weg te nemen

3. Omdat het gaat om individuele dieren die ziektebeelden in verschillende gradaties kunnen ontwikkelen, zal voor elk dier opnieuw deze afweging gemaakt moeten worden. De verantwoordelijkheid hiervoor ligt altijd bij de begeleidende dierenarts.

4. Als het varken niet meer functioneel is in het onderzoek, zelfs als het dier gering lijdt, wordt deze geëuthanaseerd.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

Op basis van de experimenten verwachten wij niet dat deze HEP’s gehaald worden.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van

'terminaal', 'licht', 'matig' of *'ernstig'* ongerief.

Vanwege de kortdurende anaesthesie: Licht. De tatoeage is onder anaesthesie (lokaal en algeheel) en er is geen pijn te verwachten na de behandeling.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

x Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

De huid is nodig voor analyse resultaten

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

x Ja

Bijlage
Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproeef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 2 Type dierproef: *testen van de antigen transfer van de huid naar de lymfknoop*

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

De 1e proef in deze fase is om te testen of het 'antigeen-transfer-model' werkt in varkens en wordt als volgt opgezet: Er worden in elk van 4 varkens 4 tattoos gezet, in de beide liezen en beide oksels. De lokalisatie verschilt per dier zodanig dat elk preparaat op elke lokalisatie aangebracht wordt. Hiervoor worden 4 parameters getest op dezelfde manier als beschreven voor fase1. Als bij 1 van de 4 geteste condities zsGreen positieve APCs in de DLN kunnen worden gedetecteerd, wordt met die conditie als controle nog een drietal extra parameters getest in een identiek opgezette proef met 4 dieren.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Onder anaesthesie en lokale analgesie (in de depilatiecreme) wordt de huid bij de oksels en de liezen een dier (van 20-30kg) voorbehandeld

en getatoeëerd zoals hieronder beschreven. Er wordt voorbehandeld met depilatie creme (VEET) waaraan 2% w/w prilocaine is toegevoegd en 2% w/w lidocaïne voor lokale anaesthesie. Deze crème wordt enkele minuten op de huid gehouden en daarna weggewassen met water.

Voor dit deel van het project wordt getatoeëerd met pDNA geformuleerd in polyplexen op de manier die in fase1 de hoogste expressie liet zien.
Het pDNA in deze fase codeert voor een groen fluorescent eiwit, te weten zsGreen. De backbone van het plasmide is wederom pVAX. Het zsGreen is licht gemodificeerd. Er is namelijk een gecombineerde palmitoylatie / myristoylatie tag aan de N-terminus gezet, waardoor het zsGreen eiwit naar de lipide bimembranen wordt getarget. In muizen kan na een tattoo dit 'pamyr-zsGreen' eiwit dmv flow-cytometrie in antigeen presenterende cellen (APCs) in de drainerende lymfknoop gedetecteerd worden. Het aantal zsGreen positieve APC's geeft een indicatie van de efficiëntie van de transfer van het antigeen van de huid naar de DLN. Het doel van deze fase is om te kijken of dit ook in varkens lukt. Als dat inderdaad lukt dan worden vervolgens extra modificaties getest in het tattoo protocol waarmee de antigen transfer van het eiwit mogelijk verbetert.

De 1e proef in deze fase is om te testen of het 'antigeen-transfer-model' werkt in varkens en wordt als volgt opgezet: Er worden in elk van 4 varkens 4 tattoos gezet, in de beide liezen en beide oksels. Hiervoor worden 4 parameters getest op dezelfde manier als beschreven voor fase1:
geen penetration enhancer
occlusie onder huishoudfolie
verlengde VEET behandeling en occlusie
verlengde VEET behandeling, occlusie en DMSO creme
Als bij 1 van de 4 geteste condities zsGreen positieve APCs in de DLN kunnen worden gedetecteerd, wordt met die conditie als controle nog een drietal extra parameters getest in een identiek opgezette proef met 4 dieren., Getest worden: lemonene, chloroform/methanoloplossing en als laatste een dubbele verlengde voorbehandeling met VEET. Dit alles gebeurt met adequate pijnstilling.

Op dag 1 en 2 wordt de huid geïnspecteerd, om een indicatie te krijgen van de toxiciteit. Er wordt geen toxiciteit verwacht. Alle aanvullende handelingen zijn standaard in de humane dermatologie.

Op dag 3 wordt elk dier geëuthanaseerd, waarna de drainerende lymfknopen worden geexcideerd en op ijs naar het NKI worden vervoerd. Daar worden de samples direct ex vivo opgewerkt voor flow-cytometrie en geanalyseerd.
De varkens worden beperkt (d.w.z. bijna adlib) gevoerd, waarbij voeropname en wateropname gescoord worden om een indicatie te krijgen voor de systemische toxiciteit. Daarnaast zal een klinische score uiteraard onderdeel uitmaken van het bepalen van systemische toxiciteit. De ervaring met challenge-experimenten leert dat varken minder eten wanneer ze ziek worden. De verwachting is dat dit niet zal gebeuren in dit experiment, ondanks het feit dat antigenen wel zeer beperkt systemisch zouden kunnen worden of de interferonen/interleukines, die gevormd kunnen worden. Lokale toxiciteit wordt klinisch gescoord door inspectie van de behandelde huid.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Het aantal van 4 waarnemingen komt uit proeven met muizen, en we verwachten dat varkens op eenzelfde manier zullen reageren als muizen. De sigma van de entiteit ' absoluut aantal groene cellen in de DLN' voor de fase 2 proeven is 200
Met een sample size van 4 dieren is de standard error 200/wortel 4 = 100
Met deze sample size kunnen we dan met 95% power een verschil van 203 (2.03x standard error of the mean) groene cellen aantonen. Een kleiner verschil is niet interessant.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Varkens, afkomstig van een erkende leverancier (De Tolakker), 12 dieren van 20-30 kg (9-10 weken oud), geslacht niet van belang

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

x Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☐ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

We proberen tijdens de eerste fasen van de proeven een aantal variabelen uit opdat we in de laatste fase met het optimale product de challenge doen. Daardoor worden minder dieren gebruikt dan wanneer voor iedere formulering een fase 4 experiment gedaan wordt. Er zijn reeds ervaringen in muizen doch dit diermodel is niet voldoende voorspellend voor de mens. Daarnaast hebben we in fase 0 de techniek reeds geoptimaliseerd op de huid van in ander kader gedode varkens. Daarnaast proberen we om de invloed van lokalisatie op het dier te kwantificeren en dus ook te minimaliseren door 4 monsters op een dier te testen en elk monster op de verschillende lokalisaties op het dier. Verder is uiteindelijk het varken ook doeldier.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

We gebruiken algehele anaesthesie bij het tatoeeren bij de toepassing van VEET wordt bovendien een locaal anaestheticum gebruikt

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

nvt

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

X Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

x Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

x Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

x Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

De dieren worden getatoeeerd onder lokale analgesie. Bij de toepassing van VEET wordt ook een locaal anaestheticum toegevoegd. De dieren worden gesedeerd alvorens ze met een overdosis barbituraat geeuthanaseerd worden.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

x Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Humaan eindpunt

Een dierproef brengt met zich mee dat dieren tijdens het experiment onaanvaardbaar lijden en dat ze geëuthanaseerd dienen te worden, het zgn. humaan eindpunt. In deze bijlage zijn de criteria voor het humane eindpunt geformuleerd.

Gehanteerde criteria ten aanzien van dierwelzijn en humaan eindpunt

- Een van de belangrijke doelen voor het experiment is de follow-up van de dieren. Medicatie kan het ziekteverloop en de uitkomst van het experiment beïnvloeden en vanuit dit oogpunt wordt daar terughoudend mee omgegaan. Wanneer er naar het oordeel van de verantwoordelijke dierenarts pijnstilling nodig is en dit niet strijdig is met de doelstelling van het experiment, wordt dit echter altijd toegediend.
- Humaan eindpunt: wanneer het lijden van een dier niet langer opweegt tegen het nut dat dit dier voor het onderzoek heeft, wordt het dier eerder geëuthanaseerd.
- Indien het dier een ernstige mate van ongerief heeft, wordt deze geëuthanaseerd.

Criteria:
Doel van het formuleren van deze criteria is het nauwkeurig vastleggen van het “vroegste” eindpunt.
De volgende criteria worden gehanteerd:

1. Algemene criteria:
   a. Het ‘Analogieprincipe’
   b. Het voorkomen van spontaan dood gaan/ernstige pijn
   c. Het minimaliseren van de duur van ongerief

2. Specifieke criteria (mede op basis van het uitgevoerde klinisch onderzoek, observaties, verslaglegging & monitoring):
   De varkens krijgen, indien er verschijnselen van pijn waargenomen worden, adequate pijnstilling toegediend. Een varken heeft een drive om te eten en drinken, derhalve is het belangrijkste criterium om varkens te euthanaseren:
   - niet meer eten en/of drinken: Als een varken stopt met eten en drinken, dan is het varken lijdende.
   - sterk vermageren (in de tijd; monitoring BCS/± 20% verlies in 2 dagen)
   - duidelijke pijngeluiden (tandenknarsen, kreunen)
   - sterk verhoogde pols en ademhaling t.g.v. hevige benauwdheid
   - wanneer het niet mogelijk blijkt de verschijnselen van pijn d.m.v. pijnstilling weg te nemen

3. Omdat het gaat om individuele dieren die ziektebeelden in verschillende gradaties kunnen ontwikkelen, zal voor elk dier opnieuw deze afweging gemaakt moeten worden. De verantwoordelijkheid hiervoor ligt altijd bij de begeleidende dierenarts.

Als het varken niet meer functioneel is in het onderzoek, zelfs als het dier gering lijdt, wordt deze geëuthanaseerd.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

Op basis van de experimenten verwachten wij niet dat deze HEP’s gehaald worden

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van '*terminaal', 'licht', 'matig'* of *'ernstig'* ongerief.

Vanwege de kortdurende anaesthesie: Licht. De tatoeage is onder anaesthesie (lokaal en algeheel) en er is geen pijn te verwachten na de behandeling.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

x Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

De huid en de lymfknopen die het gebied draineren zijn nodig voor analyse resultaten

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

x Ja

Bijlage
Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 3 Type dierproef: *locale adjuvantia voor optimale CTL inductie*

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Voor deze fase wordt het DNA tattoo protocol aangepast, waarbij getatoeëerd wordt met een nabehandeling en voorbehandeling, die leidt tot optimale antigeen transfer, op basis van de bovenbeschreven proeven. In fase3 wordt gezocht naar adjuvantia, waarmee door middel van verbeterde APC-maturatie de priming van vaccin-specifieke CTL kan worden verbeterd. Onze ervaring in muizen is dat dit nauwelijks invloed heeft op de antilichaam respons. Het doel hierbij is om een dermate goede CTL inductie te bewerkstelligen dat de CTL direct ex vivo in perifeer bloed kunnen worden gedetecteerd met ELISPOT, zodat we het beste adjuvant eenvoudig kunnen kiezen. Tevens zal in fase 3 ook een Haemagglutinine toegevoegd worden om de optimale combinatie voor fase 4.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

In deze fase vaccineren we met het beste DNA vaccin dat we hebben in muizen: een pDNA dat codeert voor de geinactiveerde E6 and E7 antigenen van het HPV virusserotype 16. Er is aan de N-terminus een stuk van het tetanus toxine toegevoegd en verder zit er een signaal peptide aan de N-terminus en een KDEL sequentie aan de C-terminus en het haemagglutinine voor fase 4. Dit zijn door trial and error gevonden aanpassingen die de CTL inductie in muizen verbeteren. Opmerkelijk is dat ze voor andere antigenen niet helpen, maar voor dit E6-E7 vaccin wel.
Dit experiment bestaat uit 3 groepen van 3 dieren in een groep, die elk 2-maal worden gevaccineerd met het E6-E7vaccin, met een interval van 2 weken. Voor start van de vaccinatie, op moment van de tweede vaccinatie en op dag 7, dag 14 en dag 21 na de 2e vaccinatie wordt perifeer bloed afgenomen, wat wordt geanalyseerd in het NKI voor CTL inductie en op antilichamen voor HA. In elk van de 3 groepen wordt een adjuvant getest, dat geselecteerd is op basis van werkzaamheid in muizen en op basis van praktische toepasbaarheid. In groep 1 wordt geen adjuvant gebruikt. In groep 2 wordt een pDNA dat codeert voor een fragment van flagelline van Salmonella typhimurum toegevoegd aan het E6-E7 DNA vaccin. In groep 3 wordt een subcutaan depot met gardiquimod (een synthetisch TLR7 ligand) in IFA gespoten onder de getatoeëerde huid, 1 dag na elk van de 2 vaccinaties.
Deze proef wordt of herhaald in dezelfde opzet met het nanopartikel dat in fase2 als op een na beste testte, in identieke opzet als hierboven beschreven, of als 1 van deze adjuvantia de respons significant verbetert, wordt een extra experiment gedaan waarbij het meest werkzame adjuvant wordt geformuleerd voor transcutane slow-release toediening door 20Med . In het geval het pDNA dat codeert voor flagelline de CTL inductie verbetert (en verder geen van de adjuvantia) is dit natuurlijk niet nodig. In deze proef wordt een controle groep zonder penetration enhancer of adjuvant, een controle groep met penetration enhancer zoder adjuvant, en de experimentele groep, met penetration enhancer en transdermaal adjuvant getest. Dit gebeurt in de 3x3opzet, met vaccinatie op d0 en d14.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Het aantal van 3 waarnemingen komt uit proeven met muizen. De sigma van de entiteit ' absoluut aantal groene cellen in de DLN' voor de fase 2 proeven is 200
Met een sample size van 3 dieren is de standard error 200/wortel 3 = 115
Met deze sample size kunnen we dan met 95% power een verschil van 234 (2.03x standard error of the mean) groene cellen aantonen. Een kleiner verschil is niet interessant.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Varkens, afkomstig van een erkende leverancier (De Tolakker), 18 dieren van 20-30 kg (9-10 weken oud), geslacht niet van belang

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

x Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☐ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

We proberen tijdens de eerste fasen van de proeven een aantal variabelen uit opdat we in de laatste fase met het optimale product de challenge doen. Daardoor worden minder dieren gebruikt dan wanneer voor iedere formulering een fase 4 experiment gedaan wordt. Er zijn reeds ervaringen in muizen doch dit diermodel is niet voldoende voorspellend voor de mens. Daarnaast hebben we in fase 0 de techniek reeds geoptimaliseerd op de huid van in ander kader gedode varkens. Daarnaast proberen we om de invloed van lokalisatie op het dier te kwantificeren en dus ook te minimaliseren door 4 monsters op een dier te testen en elk monster op de verschillende lokalisaties op het dier. Verder is uiteindelijk het varken ook doeldier.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

We gebruiken algehele anaesthesie bij het tatoeeren bij de toepassing van VEET wordt bovendien een locaal anaestheticum gebruikt.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

nvt.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

X Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

x Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

x Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

x Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

De dieren worden onder lokale en algehele anaesthesie getatoeeerd. Ook bij toepassing van VEET wordt locale anaesthesie toegepast. De dieren worden gesedeerd alvorens ze met een overdosis barbituraat geeuthanaseerd worden

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Op grond van 'lange peptide' vaccinatie studies, met IFA en adjuvantia, uitgevoerd in Leiden worden geen granulomen verwacht, wel steriele infiltraten.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

x Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Humaan eindpunt

Een dierproef brengt met zich mee dat dieren tijdens het experiment onaanvaardbaar lijden en dat ze geëuthanaseerd dienen te worden, het zgn. humaan eindpunt. In deze bijlage zijn de criteria voor het humane eindpunt geformuleerd.

Gehanteerde criteria ten aanzien van dierwelzijn en humaan eindpunt

- Een van de belangrijke doelen voor het experiment is de follow-up van de dieren. Medicatie kan het ziekteverloop en de uitkomst van het experiment beïnvloeden en vanuit dit oogpunt wordt daar terughoudend mee omgegaan. Wanneer er naar het oordeel van de verantwoordelijke dierenarts pijnstilling nodig is en dit niet strijdig is met de doelstelling van het experiment, wordt dit echter altijd toegediend.
- Humaan eindpunt: wanneer het lijden van een dier niet langer opweegt tegen het nut dat dit dier voor het onderzoek heeft, wordt het dier eerder geëuthanaseerd.

- Indien het dier een ernstige mate van ongerief heeft, wordt deze geëuthanaseerd.

Criteria:
Doel van het formuleren van deze criteria is het nauwkeurig vastleggen van het “vroegste” eindpunt.
De volgende criteria worden gehanteerd:

1. Algemene criteria:
   a. Het ‘Analogieprincipe’
   b. Het voorkomen van spontaan dood gaan/ernstige pijn
   c. Het minimaliseren van de duur van ongerief

2. Specifieke criteria (mede op basis van het uitgevoerde klinisch onderzoek, observaties, verslaglegging & monitoring):
   De varkens krijgen, indien er verschijnselen van pijn waargenomen worden, adequate pijnstilling toegediend. Een varken heeft een drive om te eten en drinken, derhalve is het belangrijkste criterium om varkens te euthanaseren:
   - niet meer eten en/of drinken: Als een varken stopt met eten en drinken, dan is het varken lijdende.
   - sterk vermageren (in de tijd; monitoring BCS/± 20% verlies in 2 dagen)
   - duidelijke pijngeluiden (tandenknarsen, kreunen)
   - sterk verhoogde pols en ademhaling t.g.v. hevige benauwdheid
   - wanneer het niet mogelijk blijkt de verschijnselen van pijn d.m.v. pijnstilling weg te nemen

3. Omdat het gaat om individuele dieren die ziektebeelden in verschillende gradaties kunnen ontwikkelen, zal voor elk dier opnieuw deze afweging gemaakt moeten worden. De verantwoordelijkheid hiervoor ligt altijd bij de begeleidende dierenarts.

4. Als het varken niet meer functioneel is in het onderzoek, zelfs als het dier gering lijdt, wordt deze geëuthanaseerd.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

Op basis van de experimenten verwachten wij niet dat deze HEP’s gehaald worden.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van ‘*terminaal*’, *‘licht’*, *‘matig’* of *‘ernstig’* ongerief.

Vanwege de kortdurende anaesthesie: Licht. De tatoeage is onder anaesthesie (lokaal en algeheel) en er is geen pijn te verwachten na de behandeling.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

x Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

De huid en de lymfknopen die het gebied draineren zijn nodig voor analyse resultaten

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

x Ja

7

Bijlage
Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproeef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 4 Type dierproef: *Antilichaam en CTL inductie tegen varkens griep virus*

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

In deze proef wordt gevaccineerd volgens een regime waarbij de voor- en nabehandeling na elke tattoo verder is aangepast op basis van de proeven in fase3, namelijk met toevoeging van het best werkende adjuvant, idealiter in transdermale formulering en toegepast voor bescherming tegen influenza.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Er wordt in deze proef in eerste instantie getest of vaccinatie met pDNA dat codeert voor zowel haemaglutinine als Nucleoproteine (van een varkensinfluenza strain naar keuze) antilichamen en CTL induceert.
Hiervoor worden 6 dieren met leeg pVAX gevaccineerd , 6 dieren met pVAX dat codeert voor antigenen van het pathogeen, 6 dieren met een

commercieel beschikbaar controle vaccin en 6 dieren niet gevaccineerd. Na de 2 tattoos (met een interval van 2 weken) wordt op dag 7,14 en 21 na de laatste tattoo PBL afgenomen voor CTL analyse en haemagglutinatie essays. Hierna worden de dieren een maand op stal gelaten. Daarna worden ze intranasaal gechallenged met de corresponderende influenza strain. Het eindpunt bestaat uit keelswabs voor viral load, klinische symptoom scores en serologie, waarna de dieren worden geeuthanaseerd.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

De opzet is analoog aan de publicatie van Loeffen WL, de Vries RP, Stockhofe N, van Zoelen-Bos D, Maas R, Koch G, Moormann RJ, Rottier PJ, de Haan CA**.** Vaccination with a soluble recombinant hemagglutinin trimer protects pigs against a challenge with pandemic (H1N1) 2009 influenza virus.Vaccine.2011 Feb 11;29(8):1545-50. Het verschil in virusexcretie is zodanig dat 6 dieren per groep voldoende moeten zijn.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Varkens, afkomstig van een erkende leverancier (De Tolakker), 24 dieren van 20-30 kg (9-10 weken oud), geslacht niet van belang

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

x Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☐ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

We proberen tijdens de eerste fasen van de proeven een aantal variabelen uit opdat we in de laatste fase met het optimale product de challenge doen. Daardoor worden minder dieren gebruikt dan wanneer voor iedere formulering een fase 4 experiment gedaan wordt. Er zijn reeds ervaringen in muizen doch dit diermodel is niet voldoende voorspellend voor de mens. Daarnaast hebben we in fase 0 de techniek reeds geoptimaliseerd op de huid van in ander kader gedode varkens. Verder is uiteindelijk het varken ook doeldier. Gezien de resultaten van Loeffen et al. 2011 zouden in dit onderdeel 6 dieren per groep voldoende moeten zijn om evt verschillen aan te tonen.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

We gebruiken algehele anaesthesie bij het tatoeëren bij de toepassing van VEET wordt bovendien een locaal anaestheticum gebruikt.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

nvt

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

X Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

x Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

x Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

x Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

De dieren worden onder lokale en algehele anaesthesie getatoeeerd. De dieren worden gesedeerd alvorens ze met een overdosis barbituraat geeuthanaseerd worden.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De anaesthesie geeft lichte welzijnsaantasting, de challenge met influenza-virus kan, zeker bij de niet gevaccineerde controledieren matig ongerief tot gevolg hebben.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

x Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Humaan eindpunt

Een dierproef brengt met zich mee dat dieren tijdens het experiment onaanvaardbaar lijden en dat ze geëuthanaseerd dienen te worden, het zgn. humaan eindpunt. In deze bijlage zijn de criteria voor het humane eindpunt geformuleerd.

Gehanteerde criteria ten aanzien van dierwelzijn en humaan eindpunt

- Een van de belangrijke doelen voor het experiment is de follow-up van de dieren. Medicatie kan het ziekteverloop en de uitkomst van het experiment beïnvloeden en vanuit dit oogpunt wordt daar terughoudend mee omgegaan. Wanneer er naar het oordeel van de verantwoordelijke dierenarts pijnstilling nodig is en dit niet strijdig is met de doelstelling van het experiment, wordt dit echter altijd toegediend.
- Humaan eindpunt: wanneer het lijden van een dier niet langer opweegt tegen het nut dat dit dier voor het onderzoek heeft, wordt het dier eerder geëuthanaseerd.
- Indien het dier een ernstige mate van ongerief heeft, wordt deze geëuthanaseerd.

Criteria:
Doel van het formuleren van deze criteria is het nauwkeurig vastleggen van het “vroegste” eindpunt.
De volgende criteria worden gehanteerd:

1. Algemene criteria:
   a. Het ‘Analogieprincipe’
   b. Het voorkomen van spontaan dood gaan/ernstige pijn
   c. Het minimaliseren van de duur van ongerief

2. Specifieke criteria (mede op basis van het uitgevoerde klinisch onderzoek, observaties, verslaglegging & monitoring):
   De varkens krijgen, indien er verschijnselen van pijn waargenomen worden, adequate pijnstilling toegediend. Een varken heeft een drive om te eten en drinken, derhalve is het belangrijkste criterium om varkens te euthanaseren:
   - niet meer eten en/of drinken: Als een varken stopt met eten en drinken, dan is het varken lijdende.

- sterk vermageren (in de tijd; monitoring BCS/± 20% verlies in 2 dagen)
- duidelijke pijngeluiden (tandenknarsen, kreunen)
- sterk verhoogde pols en ademhaling t.g.v. hevige benauwdheid
- wanneer het niet mogelijk blijkt de verschijnselen van pijn d.m.v. pijnstilling weg te nemen

3. Omdat het gaat om individuele dieren die ziektebeelden in verschillende gradaties kunnen ontwikkelen, zal voor elk dier opnieuw deze afweging gemaakt moeten worden. De verantwoordelijkheid hiervoor ligt altijd bij de begeleidende dierenarts.

4. Als het varken niet meer functioneel is in het onderzoek, zelfs als het dier gering lijdt, wordt deze geëuthanaseerd.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

Op basis van de experimenten verwachten wij niet dat deze HEP's gehaald worden, ook niet na challenge van ongevaccineerde dieren.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van '*terminaal*', '*licht*', '*matig*' of '*ernstig*' ongerief.

De anaesthesie geeft lichte welzijnsaantasting, de challenge met influenza-virus kan, zeker bij de niet gevaccineerde controledieren matig ongerief tot gevolg hebben. Dus voor het geheel matig ongerief.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

x Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

De huid en de lymfknopen die het gebied draineren zijn nodig voor analyse resultaten

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

x Ja

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2015.II.803.013
2. Titel van het project : DNA vaccinatie met nanopartikels
3. Titel van de NTS : Een nieuwe vaccinatiemethode bij varkens en mensen

4. Type aanvraag:
   - ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
   - ☐ wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

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

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ☒ ontvangen door DEC: 01-07-2015
   - ☐ aanvraag compleet:
   - ☒ in vergadering besproken: 08-07-2015 en 23-09-2015
   - ☒ anderszins behandeld: per email: 12-10-2015
   - ☒ termijnonderbreking(en) van / tot : 14-07-2015 tot 10-09-2015
     30-09-2015 tot 09-10-2015

   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
   - ☐ aanpassing aanvraag:
   - ☒ advies aan CCD: 17-11-2015

7. Eventueel horen van aanvrager
   - Datum: 23-09-2015
   - Plaats: Utrecht
   - Aantal aanwezige DEC-leden: 7 DEC-leden
   - Aanwezige (namens) aanvrager: Aanvrager Dierenarts en de Klinisch Oncoloog Internist
   - Strekking van de vragen:
     - Wat is precies het doel van de studie?
     - Waarop berust de keuze voor het gebruik van influenza?
   - Strekking van de antwoorden:
     - Het doel wordt als volgt toegelicht: de clinicus licht toe dat er bij de mens grote behoefte is aan een vaccinatiemethode die T-cel cytotoxie (cellulaire immuniteit) induceert. Hij heeft daartoe hoge verwachtingen van DNA-vaccinatie met de tattootechniek en heeft daarom met een varkensspecialist contact gezocht om een en ander nader uit te zoeken in het varkensmodel, omdat de huid van het varken

sterk overeenkomt met de huid van de mens. Voor beide partners in dit projectvoorstel is de preklinische studie naar optimale transfectie methode, penetratie enhancer en bepaling van de inductie van cellulaire en humorale immuniteit (bijlagen 1 t/m 3) van belang. In bijlage 4 wordt een challenge met influenza uitgevoerd om de werkzaamheid van de vaccinatie te testen in het doeldier het varken. Dit onderdeel is van belang voor de diergeneeskunde. De varkenshuid lijkt veel op de mensenhuid, daarna komt de huid van naakte cavia's in de buurt. Voor het verder ontwikkelen van de tattoo methode voor toepassing bij de mens zal METC-goedkeuring nodig zijn.

- Voor wat betreft de keuze van het influenzavirus wordt toegelicht dat bij gebruik van NP T-cel immuniteit wordt geïnduceerd en ook antilichamen. Als dit model een goede T-cel functie kan induceren dan is de verwachting dat ook een goede humorale immuniteit wordt gegenereerd. De noodzaak van het kunnen beschikken over een goed vaccin tegen influenza bij varkens en bijbehorende vaccinatiemethode is toegelicht en is evident.

- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 14-07-2015 en 30-09-2015 en 16-10-2015
- Datum: 14-07-2015
- Strekking van de vragen:
- NTS 3.4 Verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdierendieren: Voor de controlegroep kan deze regel niet gelden. De DEC verzoekt u ook een regel te schrijven voor deze groep.
- Projectvoorstel 3.1 Achtergrond: De DEC vraagt zich af of deze vorm van behandeling toepasbaar zal worden in de varkensindustrie, vanwege de tijd die het kost. Graag uw visie hierop. Tevens graag toelichten hoe het tatoeëren in de praktijk gaat.
- 3.1 Achtergrond: De DEC vraagt zich af hoe de translatie naar de mens is. Graag beter onderbouwen waarom de huid van een varken vergelijkbaar is met die van de mens met betrekking tot deze methode, waarbij u ook aandacht besteedt aan mogelijke verschillen in anatomie en fysiologie
- 3.1 Achtergrond: U noemt onder meer dat het een voordeel is dat er cellulaire immuniteit ontstaat. Echter, bij influenza is met name humorale immuniteit belangrijk. De DEC vraagt zich daarom af waarom u zich in uw onderzoek niet richt op een ander, voor het varken relevant, viraal vaccin waarbij cellulaire afweer nodig is.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: Met betrekking tot fase 3 merkt de DEC wederom op dat er bij influenza met name gekeken moet worden naar humorale immuniteit, in plaats van cellulaire immuniteit. Daarbij zijn adjuvantia die leiden tot optimale cellulaire immuniteit mogelijk niet het beste voor de inductie van antilichamen tegen HA. Graag toelichten.

- 3.4 Onderzoeksstrategie: Het is de DEC niet duidelijk waarom u niet dezelfde vectoren gebruikt in fase 3 en 4, bijvoorbeeld HA en NP in plaats van HA en NA. Graag toelichten en noemen of u nu NP of NA test.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC wijst u erop dat er op de dag van de challenge ook bloed moet worden afgenomen om naar HA titers te kunnen kijken. Graag toevoegen.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: U spreekt over neuramidase. Dit moet neuraminidase zijn. Graag aanpassen.
- Bijlage 2 A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Het bepalen van systemische toxiciteit door de voeropname te meten is onvoldoende. De DEC verzoekt u daarom een andere methode hiervoor te kiezen. Daarbij vraagt de DEC zich af waarom de dieren beperkt gevoerd worden. Graag toelichten.

- Bijlage 4 B. De dieren: U noemt dat de varkens worden geselecteerd op basis van MHC-type. De DEC vraagt zich af of dat nodig is, hoe u dit doet en wat deze geselecteerde groep betekent voor wat u wilt bereiken. Graag toelichten.

- Datum antwoord: 10-09-2015
- Strekking van de antwoorden:
- Niet technische samenvatting: regel toegevoegd.
- 3.1 toepassing in de varkensindustrie: Een directe toepassing op deze manier zien we nog niet, we staan slechts aan het begin van een evt. ontwikkeling.
- 3.1 Literatuur toegevoegd aangaande de overeenkomst humane huid-varkenshuid: Summerfield A, Meurens F, Ricklin ME, The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. Mol. Immunol. 2015 Jul;66(1):14-21.
  Ploemen IH, Hirschberg HJ, Kraan H, Zeltner A, van Kuijk S, Lankveld DP, Royals M, Kersten GF, Amorij JP. Minipigs as an animal model for dermal vaccine delivery. Comp Med. 2014 Feb;64(1):50-4. Daarnaast wordt bij brandwonden onderzoek veel gebruik gemaakt van varkenshuid eveneens bij andere vormen van wondgenezing.
- 3.1 Voldoende titer antilichamen tegen HA is een bewezen correlatie met bescherming. Cellulaire immuniteit tegen nucleoproteine is in proefdieren ook gecorreleerd met bescherming (Luo et al., Virol J. 2012:286. Induction of cross-protection against influenza A virus by DNA prime-intranasal protein boost strategy based on nucleoprotein, en Wang et al., PLoS One. 2012;7(12): e52488 Robust immunity and heterologous protection against influenza in mice elicited by a novel recombinant NP-M2e fusion protein expressed in E. coli.). Opzet van experiment 4 was juist om met cellulaire immuniteit tegen nucleoproteinen bescherming te krijgen. In eerste instantie was HA toegevoegd in fase 4, we willen graag discussiëren over juist het weglaten van HA. Indien de DEC het weglaten van HA niet goedkeurt, willen we in fase 3 ook HA toevoegen.
- 3.4 Gebruik adjuvantia: zie boven de reactie waarom we juist ook cellulaire immuniteit willen stimuleren.

- 3.4 Gebruik vectoren lichten we toe ter vergadering, want dit had een relatie met het doel van experiment 4.
- 3.4 Bloed afnemen op dag van challenge: In het projectvoorstel is reeds genoemd dat ook inductie van antilichamen een uitleesparameter is, er wordt verwezen naar een artikel van Loeffen et al, waar dat ook gebeurd is, in bijlage 4 is beschreven dat serologie een van de uitleesparameters is, in het werkprotocol zal dat ook benoemd worden.
- 3.4 neuraminidase hersteld en verwijderd.
  Bijlage 2: De varkens worden beperkt gevoerd, omdat we willen weten hoeveel ze opnemen. Het beperkt voeren zal tegen ad lib opname aan zitten. Daarnaast zullen we wateropname ook scoren. Uiteraard worden de dieren ook dagelijks klinisch gescoord en wordt gelet op uitingen van ongerief zoals tandenknarsen en kreunen.
- Bijlage 4: De opmerking over MHC type is gewist, omdat we met een ELISPOT werken.

- Datum: 30-09-2015
- Strekking van de vragen:
- DEC-formulier: Graag de vragen 1c t/m 1e nog invullen.
- Projectvoorstel: De DEC verzoekt u het doel nog verder aan te scherpen. Het "dubbele" doel moet beter worden uitgelegd. De DEC raadt u aan om het preklinisch onderzoek als hoofddoel te noemen en het onderzoek in varkens als spin-off hiervan. Dus tot en met bijlage 3 betreft het fundamenteel onderzoek voor de mens, daarna is het onderzoek translationeel voor het varken. Daarbij tevens aangeven dat vanwege de overeenkomst met de mens is gekozen voor de varkenshuid en dat het onderzoek op die manier tevens kan dienen voor de ontwikkeling van een betere vaccinatiemethode voor varkens.
- Graag nog het gebruik van HA toevoegen aan bijlagen 3 en 4.

- Antwoord: 09-10-2015
- Strekking van het antwoord:
- Hierbij de aangepaste documenten wat betreft doelstelling en gebruik van HA. Mochten er bij u nog vragen zijn of onvolkomenheden gesignaleerd worden, dan hoor ik dit graag.

- Datum: 16-10-2015
- Strekking van de vraag: De DEC heeft geconstateerd dat u een power van 95 % gebruikt en is van mening dat in uw nog exploratieve project een power van 80% voldoende zou moeten zijn.

- Antwoord: 16-10-2015
- Strekking van het antwoord: Uw opmerking omtrent de power heb ik niet gehonoreerd, omdat drie dieren een minimaal aantal is om uitspraken te doen. Door kansprocessen zou een afwijkende uitkomst ons enerzijds een verkeerde conclusie kunnen laten trekken of bij twee dieren ons in het ongewisse kunnen laten wat betreft de conclusie. Derhalve lijkt het me

juist om de experimenten met drie dieren per groep uit te voeren. Mocht u ondanks deze motivering aanpassing in de tekst willen voorstellen, dan hoor ik het graag.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
   - Aard expertise:
   - Deskundigheid expert:
   - Datum verzoek:
   - Strekking van het verzoek:
   - Datum expert advies:
   - Expert advies:

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
   ☒ uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
   ☐ uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
   ☐ uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
   ☐ wettelijk vereist.

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstellingen.

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang omdat het onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen van een effectieve vaccinatiemethode met een DNA vaccin door middel van tatoeëren van de huid waarbij naar verwachting naast humorale immuniteit ook cellulaire immuniteit wordt geïnduceerd. Juist de inductie van cellulaire immuniteit is in de humane geneeskunde zeer gewenst, omdat bijvoorbeeld de afweer tegen tumoren verloopt via cytotoxische T-cellen. Het gebruik van de varkenshuid is daarbij essentieel, omdat deze veel - in feite de meeste - overeenkomsten heeft met de menselijke huid en het mogelijk maakt een aantal zaken goed uit te zoeken, zoals het bepalen van de meest optimale transfectiemethode, DNA-formulering en versterking van de penetratie. Deze drie punten worden in bijlagen 1t/m 3 uitgewerkt . In het varken kan ook goed worden onderzocht of T-cel cytotoxie en antilichaamvorming is gegenereerd. Het virus dat gekozen is voor de preklinische fase in het onderzoek is het HPV serotype 16. Tot zover zijn de

resultaten van belang voor mens en varken. Voor de mens zal een METC-traject moeten volgen alvorens sprake kan zijn van toepassing. Voor het varken is in dit project opgenomen (bijlage 4) een infectie proef met het varkens influenzavirus, waarbij duidelijk zal worden of de door vaccinatie geïnduceerde immuunrespons voldoende is om de infectie te voorkomen. Indien succesvol kan deze methode, of een aanpassing daarvan, toegepast gaan worden in de varkens geneeskunde waar infecties met het influenzavirus een probleem zijn.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.

5. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
   ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
   ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
   ☐ Dieren in/uit het wild (10f)
   ☐ Gefokt voor dierproeven (11)
   ☐ Zwerfdieren (10h)
   ☐ Hergebruik (1e lid 2)
   ☐ Huisvesting en verzorging
   ☐ Locatie: instelling vergunninghouder (10g)

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. In de bijlagen 1, 2 en 3 is het ongerief ingeschat als gering op basis van een kortdurende algehele anesthesie in combinatie met lokale anesthesie tijdens de tatoeëring. In bijlage 4 is het ongerief ingeschat als matig, omdat hier een challenge plaatsvindt met influenzavirus, hetgeen zeker in de controledieren kan leiden tot een lichte benauwdheid.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. In dit project wordt een nieuwe vaccinatiemethode opgezet in varkens. Dit vereist een intact immuunapparaat en derhalve een intact en levend dier om de effectiviteit ervan goed te kunnen vaststellen. Ex vivo worden bloed en lymfekliercellen onderzocht om de cellulaire en humorale immuunrespons ten gevolge van de vaccinaties vast te stellen.

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken varkens is realistisch ingeschat en onderbouwd. Voor aanvang van de proef is vooronderzoek gedaan op varkenshuid van dieren die gedood zijn in het kader van andere experimenten voor wat betreft de toegepaste injectietechnieken en de techniek van tatoeëring.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De varkens worden door de onderzoekers intensief gemonitord. De onderzoekers testen in de eerste fasen van de proeven (bijlagen 1 t/3)een aantal variabelen uit zodat in de laatste fase (bijlage 4) optimale condities bekend zijn hetgeen betekent dat minder dieren hoeven te worden gebruikt. Daarnaast is in fase 0 de techniek van tattoeering aangeleerd en geoptimaliseerd op varkens huid van dieren die in het kader van ander onderzoek gedood zijn .

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

De doeleinden van het project zoals geformuleerd onder C3 rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van de varkens. De schade die de varkens oplopen is verantwoord, omdat uit wetenschappelijk oogpunt verwacht mag worden dat de op te zetten vaccinatiemethode bijdraagt aan het vinden van mogelijkheden om naast humorale immuniteit ook effectieve cellulaire immuniteit te induceren in de mens en in het varken. Dit is van groot belang omdat voor de afweer tegen tumoren, sommige virusinfecties en intracellulair groeiende bacteriën met name cellulaire immuniteit noodzakelijk is voor de klaring van de infectie respectievelijk de afweer tegen de tumor. Bij de mens is verbetering van de mogelijkheden om cellulaire immuniteit te induceren via vaccinatie zeer gewenst. De combinatie van een preklinisch deel van belang voor mens en dier acht de DEC een sterk punt. Het finale onderzoek dat moet bewijzen dat de methode effectief is in het doeldier het varken is een logisch sluitstuk van het project. Dit alles overwegende oordeelt de DEC unaniem dat het belang van het doel van het project opweegt tegen het ongerief dat de varkens zullen ondervinden. De DEC acht het gebruik van de dieren ethisch aanvaardbaar.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

[redacted]

9

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht
[redacted]
Postbus 12007
3501 AA UTRECHT

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002015329

Bijlagen
2

Datum 30 november 2015
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]
Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 26 november 2015.
Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002015329. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project
Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur
Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie
Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	10800
Naam instelling of organisatie:	Universiteit Utrecht
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
KvK-nummer:	30275924
Postbus:	12007
Postcode en plaats:	3501 AA UTRECHT
IBAN:	NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Afdeling:	[redacted]
Telefoonnummer:	[redacted]
E-mailadres:	[redacted]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Afdeling:	[redacted]

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?	[x] Nieuwe aanvraag [ ] Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn [ ] Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum:	1 januari 2016
Geplande einddatum:	1 januari 2018
Titel project:	DNA vaccinatie met nanopartikels
Titel niet-technische samenvatting:	DNA vaccinatie met nanopartikels
Naam DEC:	Naam DEC
E-mailadres DEC:	

Betaalgegevens

De leges bedragen:	€ 741,-
De leges voldoet u:	na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:	[x] Projectvoorstel [x] Beschrijving Dierproeven [x] Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen:	[x] DEC-advies

Ondertekening

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Plaats:	Utrecht
Datum:	25 november 2015

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht
[redacted]
Postbus 12007
3501 AA UTRECHT

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002015329

Bijlagen
2

Datum 30 november 2015
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 30 november 2015
Vervaldatum: 30 december 2015
Factuurnummer: 15700329

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002015329	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

10

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht
[redacted]
t.a.v. Instantie voor Dierenwelzijn
Postbus 12007
3501 AA Utrecht

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

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

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
AVD108002015329

Uw referentie

Bijlagen

Datum 21 december 2015
Betreft Aanvullende informatie vergunningsaanvraag

Geachte [redacted]

Op 18 november 2015 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om het project "DNA vaccinatie met nanopartikels" met aanvraagnummer AVD108002015329.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om de aanvraag verder te kunnen beoordelen:

U beschrijft in uw aanvraag de keuzemomenten tussen de verschillende dierproeven. U geeft aan dat u de meest optimale nanopartikel formulering, penetration enhancer en transdermale adjuvans zult selecteren voor de volgende fases in het onderzoek. U geeft echter niet aan op basis waarvan u zult besluiten het onderzoek niet voort te zetten. U wordt verzocht, voor elk van de fases, aan te geven of er een minimaal effect vereist is om het onderzoek in een volgende fase te kunnen voortzetten met een van de geteste stoffen. Deze vraag wordt gesteld om te voorkomen dat onnodig dieren gebruikt worden.

Opsturen informatie
U heeft 14 dagen de tijd om de ontbrekende informatie op te sturen. De CCD zou de gevraagde informatie echter graag uiterlijk donderdag 24 december 2015 van u ontvangen om uw aanvraag in de eerstvolgende vergadering te kunnen behandelen. U kunt deze informatie onder vermelding van het aanvraagnummer (AVD108002015329) aanleveren via NetFTP of per post. Indien u de informatie per post verstuurd, gebruik dan het bijgevoegde formulier.

Wanneer een beslissing
De beslistermijn op uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat bovengenoemde informatie is ontvangen. Na ontvangst van uw reactie/de ontbrekende informatie nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Datum
21 december 2015

Onze referentie
AVD108002015329

Meer informatie
Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).De CCD zou de gevraagde informatie graag uiterlijk donderdag 02 april 2015 van u ontvangen.

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:
- formulier Melding Bijlagen via de post

Centrale Commissie Dierproeven

Melding

Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op www.zbo-ccd.nl
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw gegevens

1.1 Vul de gegevens in.

Naam aanvrager			
Postcode		Huisnummer	

1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.

Aanvraagnummer	

2 Bijlagen

2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.

☐
☐
☐

3 Ondertekening

3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Naam	
Datum	- - 20
Handtekening	

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Utrecht, 23 dec 2015

Geachte CCD,

Naar aanleiding van uw vraag (dd. 21 dec. 2015, ref. AVD108002015329) omtrent de stopcondities van de verschillende fasen in het experiment doe ik u de volgende informatie toekomen.

Vraag:
U beschrijft in uw aanvraag de keuzemomenten tussen de verschillende dierproeven. U geeft aan dat u de meest optimale nanopartikel formulering, penetration enhancer en transdermale adjuvans zult selecteren voor de volgende fases in het onderzoek. U geeft echter niet aan op basis waarvan u zult besluiten het onderzoek niet voort te zetten. U wordt verzocht, voor elk van de fases, aan te geven of er een minimaal effect vereist is om het onderzoek in een volgende fase te kunnen voortzetten met een van de geteste stoffen. Deze vraag wordt gesteld om te voorkomen dat onnodig dieren gebruikt worden.

Antwoord:

In fase 0, wanneer we gebruik maken van huid van varkens, die om andere redenen gedood zijn, zal de expressie min de achtergrond significant hoger moeten zijn dan 0. De formulering met de hoogste expressie gaat vervolgens door naar fase 1.

Voor fase 1 geldt hetzelfde criterium, alleen wanneer de formulering een significant hogere expressie dan 0 geeft gaan we door naar fase 2.

Voor fase 2a geldt dat er zsGreen positieve APCs in de DLN moeten kunnen worden gedetecteerd we toch doorgaan naar fase 2. Dit is gebaseerd op ervaringen met muizen, persoonlijke mededeling van dr. A. Bins, paper is in voorbereiding. Voor fase 2b geldt dat als in geen van de condities antigen transfer kan worden vastgesteld we niet doorgaan naar fase 3.

Voor fase 3 geldt dat er een meetbare CTL expressie moet zijn, gemeten m.b.v. de ELISPOT. Zo niet dan gaan we niet door naar fase 4.

Hopelijk is het geformuleerde stappenplan verhelderd.

Met vriendelijke groeten,

[redacted]

Fase1:
idem

Fase2a:
Geen stop, als geen expressie dan wordt doorgegaan met conditie 4.

Fase 2b:
als in geen van de condities antigen transfer kan worden vastgesteld

Fase3:
Geen meetbare CTL inductie

13

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht
[redacted]
t.a.v. Instantie voor dierenwelzijn Utrecht
Postbus 12007
3501 AA Utrecht

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
AVD108002015329

Uw referentie

Bijlagen
1

Datum 19 januari 2016
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [redacted]

Op 26 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'DNA vaccinatie met nanopartikels' met aanvraagnummer AVD108002015329. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 24 december 2015 heeft u digitaal gereageerd op onze vraag.

Beslissing
Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). Hierbij geldt de algemene voorwaarde zoals genoemd in de vergunning.
U kunt met uw project 'DNA vaccinatie met nanopartikels' starten. De vergunning wordt afgegeven van 19 januari 2016 tot en met 01 januari 2018.

Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies gevoegd van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht van 17 november 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie.

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 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

Meer informatie
Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

[redacted]

ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris
Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

Bijlagen
- Vergunning
  Hiervan deel uitmakend: - DEC-advies
  - Weergave wet- en regelgeving

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: Universiteit Utrecht
Postbus: Postbus 12007
Postcode en woonplaats: 3501 AA Utrecht
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 19 januari 2016 tot en met 01 januari 2018, voor het project 'DNA vaccinatie met nanopartikels' met aanvraagnummer AVD108002015329, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. In aanvulling op het DEC advies is een algemene voorwaarde opgenomen in de vergunning.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [redacted]
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 26 november 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
    a. Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 november 2015;
    b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 november 2015;
    c. Advies van Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 november 2015;
    d. Aanvullende informatie van de aanvrager, zoals ontvangen per digitale indiening 24 december 2015

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
optimalisatie van transfectie efficiëntie door middel van polyplexen	Varkens	16	Licht
testen van de antigen transfer van de huid naar de lymfknoop	Varkens	12	Licht
locale adjuvantia voor optimale CTL inductie	Varkens	18	Licht
Antilichaam en CTL inductie tegen varkens griep virus	Varkens	24	Matig

Voorwaarden
Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen.

Algemene voorwaarde
1)In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is 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. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

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. Uit artikel 10b 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 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.
Artikel 10b schrijft 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 van Economische Zaken 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 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 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 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 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 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.

	Inventaris Wob-verzoek W16-11S								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**document**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
	NTS2015330								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x					
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Advies CCD		x						x
8	Beschikking en vergunning				x		x	x	
9	Mail terugkoppeling DEC 26-2-2016				x		x	x	

23 DEC 2015

Centrale Commissie Dierproeven

1

AVD 401002015330

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.centralecommissiedierproeven.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.

☒ Ja > *Vul uw deelnemernummer in* 40100
☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]
KvK-nummer	908104

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	Akkermaalsbos	12
Postbus	59	
Postcode en plaats	6700AB	Wageningen
IBAN	NL10RABO0397066465	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR	

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	☐ Dhr. ☒ Mw.
Functie	Onderzoeker	
Afdeling	[redacted]	
Telefoonnummer	[redacted]	
E-mailadres	[redacted]	

1.5 *(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	☒ Dhr. ☐ Mw.
Functie	[redacted]	
Afdeling	[redacted]	
Telefoonnummer	[redacted]	
E-mailadres	[redacted]	

1.6	*(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.	(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
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
		☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
2.2	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
2.3	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 einddatum van het project?	Startdatum	14 - 2 - 2016
		Einddatum	31 - 12 - 2016
3.2	Wat is de titel van het project?	Validatie van biomarkers voor immuun competentie in biggen onder praktijk omstandigheden	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Bevestigen van nieuwe meetmethoden voor darmgezondheid van varkens onder praktijkomstandigheden	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC Wageningen UR
		Postadres	Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen
		E-mailadres	dec@wur.nl

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 468 Lege

☐ Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
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.

☐ Via een eenmalige incasso

☐ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel + 1 bijlage

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

☒ bestelorder WUR 921845

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:

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- 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.
- 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	[redacted]
Functie	[redacted]
Plaats	Wageningen
Datum	21 - 12 - 2015
Handtekening	[redacted]

Format

Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.zbo.ccd.nl

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	40100
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek

1.3 Vul de titel van het project in.	Validatie van biomarkers voor immuun competentie in biggen onder praktijk omstandigheden

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Doel

Het doel van het onderzoek is om darm-gerelateerde biomarkers voor immuun-competentie te bevestigen onder praktijkomstandigheden.

Aanleiding

Het overkoepelende project waartoe deze aanvraag behoort, richt zich op het verminderen van het antibioticagebruik in de veehouderij door de weerstand en de algemene (darm-)gezondheid van landbouwhuisdieren te verhogen. Voeding of voedingsadditieven kunnen een belangrijke bijdrage leveren aan de ontwikkeling en het in stand houden van een goed functionerend maagdarmkanaal bij landbouwhuisdieren. Hierdoor dragen ze bij aan een betere weerstand tegen ziekteverwekkers en andere stressoren en verbeteren zo de gezondheidsstatus van deze dieren. Dit kan vervolgens leiden tot een reductie van het antibioticumgebruik in de veehouderij. De focus van dit onderzoek ligt op het ontwikkelen van innovatieve meettechnieken om het effect van gezondheid bevorderende voeding en voedingsadditieven op het gebied van darmgezondheid en immuniteit te kunnen meten. In het project staan de interacties in de darm tussen voedingsingrediënten, de aanwezige darmflora (microbiota) en de darmcellen van de gastheer centraal.

Achtergrond

Als onderdeel van het project is in een dierproef onder experimentele omstandigheden gekeken naar het effect van 3 voedingsadditieven op de interacties in de darm tussen de aanwezige microbiota, en de darmcellen. Hiervoor zijn 3 voedingsadditieven geselecteerd waarvan op basis van literatuur bekend is dat ze een positief effect hebben op darmgezondheid of immuniteit. Galacto-oligosaccharide hebben een positieve invloed op microbiota in het colon en op ziekteresistentie (Li et al., 2014), beta-glucanen hebben een positief effect op microflora samenstelling, performance en immunologie in de darm (Sweeney et al., 2012), terwijl middenketenige vetzuren een positief effect hebben op darmmorfologie en microbiota samenstelling en mogelijke ook op immunologische parameters (Jacobi et al., 2012). Het effect van deze drie voerinterventies is onderzocht in de darm van biggen na toevoeging van de additieven aan het lactatievoer van zeugen (indirect) en na orale toediening aan de biggen (direct). Deze beschreven effecten werden met behulp van innovatieve meettechnieken geanalyseerd om tot de identificatie van nieuwe biomarkers te komen. De read-out parameters van dit experiment waren: genexpressie in het darmepitheel, microbiota samenstelling in de darm, en darmmorfologie. Op basis van deze resultaten wordt een aantal biomarkers geselecteerd die veelbelovend zijn voor verdere analyse. Voor deze aanvraag wordt uit de drie voedingsinterventies, de interventie geselecteerd die de meest veelbelovende biomarkers heeft opgeleverd.

Project

De nog nader te benomen biomarkers zijn geïdentificeerd in biggen gehouden onder experimentele omstandigheden. Mede daardoor is slechts in een beperkte aantal biggen gemeten (maximaal 8 per tijdstip). Het doel van het huidige project is om de interventie die het grootste effect heeft laten zien op de read-out paramaters, toe te passen op een regulier varkensbedrijf in grotere aantallen dieren. In dit experiment zal gericht gekeken worden naar die biomarkers die onder experimentele omstandigheden de grootste veranderingen lieten zien. Hierbij worden uit alle drie de categorieën (genexpresie in het darmepitheel, microbiota samenstelling in de darm, en darmmorfologie) biomarkers geselecteerd. Er wordt dus gekeken naar de genen die de sterkste verandering in expressie lieten zien, en naar de bacteriële populaties die de sterkste verschuiving lieten zien. Daarnaast wordt gekeken naar de morfologie van de darm. Het doel van het experiment is om te bevestigen dat de biomarkers gevonden onder experimentele omstandigheden ook veranderen als de voedingsinterventie onder praktijkomstandigheden wordt toegepast. Daarnaast kan, door de grotere aantallen, ook worden gekeken naar het effect van de voedingsinterventie op de performance van de dieren.

Het is van belang om dit experiment uit te voeren onder praktijkomstandigheden op een varkensbedrijf omdat dit de condities zijn waaronder de biomarkers zullen worden toegepast. De belangrijkste reden om het experiment onder praktijkomstandigheden te testen, is dan ook om te bevestigen dat de eerder waargenomen biomarkers onder experimentele omstandigheden ook correleren met observaties uit de experimentele studie. Daarnaast geeft een studie op een varkensbedrijf ook een eerste indruk van de vertaling van de gevonden biomarkers naar de praktijk. De studie vormt daarmee de eerste stap om de gevonden experimentele resultaten te toetsen op een praktijkbedrijf. Wanneer blijkt dat de resultaten totaal niet vertaalbaar zijn naar de (varkens)praktijk, betekent dit een NO GO voor het project. Wanneer blijkt dat (een deel van) de resultaten wel te vertalen zijn naar de (varkens)praktijk, wordt het praktijkonderzoek uitgebreid naar meerdere varkensbedrijven. Dit maakt geen onderdeel uit van de huidige aanvraag. Het huidige experiment wordt uitgevoerd op een regulier varkensbedrijf die nauwe

samenwerking heeft met een grote voerproducent in Nederland Op dit bedrijf worden biggen gebruikt om onze vraagstelling te beantwoorden. De biggen worden opgedeeld in 2 groepen: Een groep vormt de controlegroep, deze biggen en de zeugen waarvan zij afkomstig zijn worden gevoerd met standaard voer; de tweede groep biggen en de zeugen waarvan zij afkomstig zijn ontvangen het geselecteerde voeradditief. Alle biggen in de tomen zijn onderdeel van de performance studie. Omdat dit een geregistreerd voeradditief betreft, en performance bepaling routematig op het varkensbedrijf worden uitgevoerd, maken het voerregime en de performance studie geen onderdeel uit van deze CCD-aanvraag. Om de geselecteerde, darm-gerelateerde biomarkers te kunnen meten, is het noodzakelijk om deze biggen te euthanaseren. Hiertoe worden verdeeld over de twee groepen 160 biggen geëuthanaseerd Euthanasie en sectie van de biggen vindt slechts op 1 moment plaats. Op het moment van sectie wordt ook materiaal verzameld om te onderzoeken of de biomarkers in de toekomst ook op niet of minder invasieve manier gemeten kan worden. Hiertoe wordt faeces, bloed en speeksel verzameld.

Li et al., ISME J. 2014 Aug;8(8):1609-20.

Sweeney et al., Br J Nutr. 2012 Oct;108(7):1226-34.

Jacobi et al., Adv Nutr. 2012 Sep 1;3(5):687-96.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Algemene doelstelling

Het overkoepelende project waartoe deze aanvraag behoort, richt zich op het verminderen van het antibioticagebruik in de veehouderij door de weerstand en de algemene (darm-)gezondheid van landbouwhuisdieren te verhogen. Het doel van het onderzoek is om darm-gerelateerde biomarkers voor immuun-competentie te bevestigen onder praktijkomstandigheden. Het project onderzoekt hiertoe of eerder geïdentificeerde potentiele immuun-competentie parameters (biomarkers) ook in grotere aantallen biggen gehouden op een varkensbedrijf correlatie hebben met verbeterde (darm)gezondheid als gevolg van een toegepaste voedingsinterventie. Het project draagt daarmee bij aan de ontwikkeling van een “meetlat voor immuun competentie” voor biggen, die het mogelijk maakt om het effect van (voedings)interventies op (darm)gezondheid en immuuncompetentie in biggen te meten.

Haalbaarheid

De haalbaarheid van dit project wordt als hoog ingeschat. Het project beoogt resultaten te bevestigen die onder experimentele omstandigheden zijn vastgesteld. Door gebruik te maken van een praktijkbedrijf dat een geregistreerd voeradditief met een bekend effect op darmgezondheid en immuun-competentie toepast op zeugen en zuigende biggen, kunnen de biomarkers worden gevalideerd. Het euthanaseren en samplen van biggen is weliswaar nieuw voor dit praktijkbedrijf, maar is routine

binnen een experimentele setting. Dit maakt de technische haalbaarheid groot. Inhoudelijk wordt verwacht dat de haalbaarheid groot is. De data zijn nodig om vast te stellen of de biomarkers op grotere schaal in de praktijk dezelfde correlatie laten zien als onder experimentele omstandigheden. Het experiment is dan ook geslaagd als de correlatie van (een deel van) de biomarkers bevestigd kan worden op een varkensbedrijf. Wanneer dit het geval blijkt te zijn, zullen in een vervolgstudie meer bedrijven worden betrokken. Dit maakt geen onderdeel uit van deze aanvraag. Wanneer de correlatie niet aanwezig blijkt te zijn, betekent dit een NO GO voor het project.

3.3 Belang

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

Dé belangrijke maatschappelijke uitdaging, die in deze aanvraag wordt geadresseerd, is een maatschappelijk geaccepteerde en geapprecieerde veehouderij in Nederland d.m.v. een lager gebruik van antibiotica, een verbeterd dierenwelzijn, verbeterde diergezondheid en minder belasting van het milieu. Door voerinterventies te gebruiken die immuun-competentie en groei bevorderen, wordt een bijdrage geleverd aan deze maatschappelijke ambitie. Dit project levert bio-markers op (een meetlat) voor immuuncompetentie als maat voor weerbaarheid en robuustheid. De meerwaarde van deze kennisontwikkeling is evident. Daarnaast levert dit project ook kennis op voor toepassing en validatie van nieuwe technologieën in de diervoederketen en op veehouderijniveau (bijvoorbeeld op het gebied van genexpressie, microbiota en immuniteitsmetingen). Deze metingen leveren een belangrijke bijdrage aan het begrijpen, voorspellen en sturen van immunologische en fysiologische processen.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Een geselecteerde, geregistreerde voerinterventie wordt onder praktijkomstandigheden op een varkensbedrijf toegediend aan een behandelgroep van 40 drachtige zeugen. De controlegroep van 40 zeugen ontvangt dezelfde hoeveelheid voer met dezelfde samenstelling zonder voerinterventie. De zeugen krijgen het voer vanaf het moment dat ze overgaan op lactatievoer (~1 week voor werpen) gedurende de laatste week van de dracht en de volledige lactatieperiode. Daarnaast wordt de voerinterventie ook toegediend aan de biggen in het bijvoer dat biggen standaard krijgen. Dit betreft kunstmelk van geboorte tot twee weken na geboorte en prestarter vanaf 2 weken na geboorte tot aan spenen. Er is voor gekozen om de voerinterventie in alle voeders toe te voegen om het effect te maximaliseren. Dit wordt allemaal uitgevoerd op het geselecteerde praktijkbedrijf en is geen onderdeel van deze CCD aanvraag.

Voor de validatie van de biomarkers wordt een aantal biggen ge-euthanaseerd. Dit gebeurt op 1 tijdstip, kort voor het speenmoment. Dit is het meest kritieke moment voor de biggen omdat ze voor een belangrijke transitie staan. Dat is het moment dat de varkenshouderij veel gezondheidsproblemen ervaart en immuun-competentie en darmgezondheid dus het meest relevant zijn. De biggen worden geëuthanaseerd en er wordt materiaal (darmweefsel, darminhoud, bloed) verzameld om de geselecteerde biomarkers te bepalen. Het doel hiervan is om vast te stellen of die zich onder praktijkomstandigheden op dezelfde manier manifesteren. Dit is de validatie. Naast de validatie van biomarkers wordt ook performance en gezondheid van de biggen gemonitord. Om in de toekomst de biomarkers te kunnen meten zonder biggen te hoeven euthanaseren, wordt in dit experiment ook bloed, speeksel en faeces verzameld. Deze monsters kunnen goed worden verzameld bij levende biggen. Wanneer de biomarkers ook in deze materialen correleren met de positieve effecten van de voedingsinterventie, zijn de biomarkers sneller en makkelijker te

implementeren in de praktijk en vermindert het ongerief voor de biggen.

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

Binnen het project wordt een dierexperiment uitgevoerd waarbij biomarkers voor immuun-competentie en darmgezondheid onder praktijkomstandigheden worden gevalideerd. Voor dit validatie-experiment wordt met relatief grote aantallen dieren gewerkt die onder praktijkomstandigheden gehouden worden. Dit is van groot belang omdat vastgesteld moet worden of de effecten van de geselecteerde voerinterventie op immuuncompetentie parameters relevant zijn voor de praktijk omstandigheden waaronder biggen gehouden worden. Voor dit experiment wordt gebruik gemaakt van een boerderij die, door zijn nauwe samenwerking met een grote voerproducent in Nederland, ervaring heeft met vergelijkbare experimenten. In totaal worden 80 zeugen en hun nageslacht, verdeeld over twee groepen, opgenomen in het validatie traject. Deze zeugen worden vanaf het moment dat ze lactatievoer krijgen (1 week voor de berekende werpdatum) gevoerd met de geselecteerd voerinterventie. Deze interventie zal vervolgens ook aanwezig zijn in de kunstmelk die biggen in de eerste twee weken na geboorte krijgen toegediend, evenals in de prestarter die biggen vanaf 2 weken leeftijd krijgen. De controlezeugen en –biggen krijgen lactatievoer, kunstmelk en prestarter zonder toegevoegde voerinterventie. Er is voor gekozen om de voerinterventie in alle drie de voeders toe te voegen om het effect op immuun-competentie parameters en groei te maximaliseren. Alle biggen afkomstig van de 40 zeugen zullen worden meegenomen voor de performance metingen. Dit wordt allemaal gedaan op het praktijkbedrijf als onderdeel van de dagelijkse praktijk op dit bedrijf. Dit is geen onderdeel van deze CCD aanvraag.

Om de biomarkers te kunnen valideren, wordt op één tijdstip voor het speenmoment, een deel van de biggen geëuthanaseerd. Het moment van euthanaseren is bewust juist vóór het spenen gekozen omdat in de varkenshouderij immuun competentie en (darm)gezondheid met name rond het speen-transitie moment belangrijk zijn voor het vóórkomen van speen-gerelateerde problematiek (diarree). Dit is ook het moment dat de biggen geen voordeel meer hebben van de maternale immuniteit via maternale antilichamen en wel het moeilijke transitiemoment van spenen door moeten en daarbij afhankelijk zijn van de functionaliteit van het eigen immuun systeem. De biggen worden geëuthanaseerd om de verschillende darm-gerelateerd biomarkers te kunnen meten en te valideren.

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

Het validatie-experiment is de uiteindelijk toetsing onder praktijkomstandigheden van eerdere experimenten. Het is de laatste fase van een groter project waar dit experiment onder valt. Wanneer de validatie van de biomarkers voor immuun-competentie en darmgezondheid positief uitvalt, wordt gekeken hoe deze biomarkers kunnen worden geïmplementeerd. Deze implementatie wordt uitgevoerd in nauwe samenspraak met veevoederproducenten.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.	
Volgnummer	Type dierproef
1	Validatie van biomarkers voor immuun competentie en darmgezondheid in biggen onder praktijk omstandigheden
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	40100
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	

Volgnummer	Type dierproef
1	Validatie van biomarkers voor immuun competentie en darmgezondheid in biggen onder praktijk omstandigheden

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Het doel van het experiment is om te bevestigen dat de biomarkers gevonden na toepassing van een voedingsinterventie onder experimentele omstandigheden ook veranderen als de voedingsinterventie onder praktijkomstandigheden wordt toegepast. Daarnaast kan, door de grotere aantallen, ook worden gekeken naar het effect van de voedingsinterventie op de performance van de dieren. De biomarkers worden ontwikkeld om in de praktijk op varkensbedrijven het effect van (voedings)interventies op immuuncompetentie en darmgezondheid te kunnen meten en onderling te vergelijken. Het is van belang om de geïdentificeerde biomarkers op een varkensbedrijf te bevestigen omdat vastgesteld moet worden of de experimenteel vastgestelde biomarkers voor immuuncompetentie en darmgezondheid ook daadwerkelijk relevant zijn onder de omstandigheden waaronder varkens in de praktijk worden gehouden. Het experiment wordt uitgevoerd onder normale omstandigheden op een varkensbedrijf, omdat dit de omstandigheden zijn waaronder de biomarkers uiteindelijk de gewenste correlatie met immuuncompetentie en darmgezondheid moeten hebben. Het experiment wordt uitgevoerd in samenwerking met een varkenshouder die, door jarenlange samenwerking met een veevoeder producent, ruim ervaring heeft met het testen van (voer)interventies onder praktijkomstandigheden. Omdat het een normaal, commercieel varkensbedrijf is, kunnen de resultaten gemakkelijk vertaald worden naar de praktijk.

Om de biomarkers te valideren wordt in deze validatieproef een contrast aangelegd tussen twee groepen biggen door middel van een voedingsinterventie afgeleid uit eerder onderzoek. Deze voedingsinterventie wordt geselecteerd uit 3 mogelijkheden: galacto-oligosacchariden, beta-glucanen of middenketenige vetzuren. De keuze wordt bepaald door de analyse van de biomarkers: De voedingsinterventie die de meest veelbelovende biomarkers oplevert, wordt toegepast in dit experiment. Alle drie de voedingsinterventies zijn geregistreerd voor toepassing op varkensbedrijven. Het bedrijf geeft lacterende zeugen en hun zuigende biggen de geselecteerde, geregistreerde voerinterventie met een bekend effect op darm-gerelateerde immuuncompetentie. Door biggen van deze zeugen te vergelijken met biggen van controlezeugen die de interventie niet hebben gekregen, kunnen de biomarkers worden bevestigd. Biggen uit beide groepen worden geëuthanaseerd om de verschillende darm-gerelateerde biomarkers te kunnen meten en valideren.

Voor de validatie van de geïdentificeerde biomarkers wordt een aantal biggen ge-euthanaseerd. Dit gebeurt op 1 tijdstip, kort voor het speenmoment. Dit is het meest kritieke moment voor de biggen omdat ze voor een belangrijke transitie staan. Dat is het moment dat de varkenshouderij veel gezondheidsproblemen ervaart en immuun competentie en darmgezondheid dus het meest relevant zijn. De biggen worden geëuthanaseerd en er wordt materiaal (darmweefsel, darminhoud, bloed) verzameld om de geselecteerde biomarkers te bepalen. Het doel hiervan is om vast te stellen of de biomarkers zich onder praktijkomstandigheden op dezelfde manier manifesteren. Naast deze bevestiging van eerdere resulaten, wordt ook performance en gezondheid van de biggen gemonitord. Om de biomarkers in de toekomst om minder invasieve wijze te kunnen bepalen, wordt van de biggen ook faeces, bloed en speeksel verzameld om in vervolgonderzoek te kijken of in deze monsters dezelfde biomarkers gemeten kunnen worden.

De geïdentificeerde biomarkers zijn de belangrijkste primaire uitkomstparameters. Dit gaat om de volgende zaken:

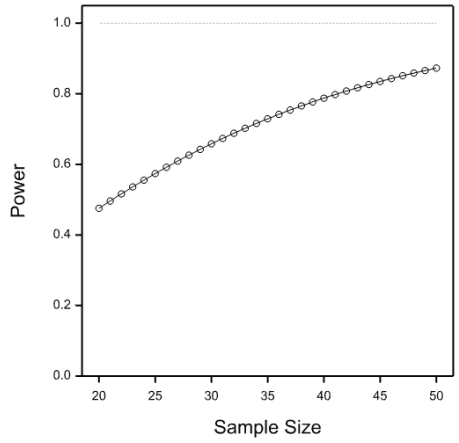
- Expressie-niveau van genen in het darmepitheel, dit wordt bepaald met behulp van qPCR
- Aanwezigheid van bepaalde bacteriën in de microbiota óf de verhouding van bepaalde bacteriën in de microbiota. Dit wordt bepaald met behulp van qPCR of 16S sequencing op microbiota
- Morfologische parameters, dit wordt bepaald door histologie of immunohistochemie.

Uit het onderzoek onder experimentele omstandigheden zijn biomarkers uit alle drie de categoriën geïdentificeerd. Zo zijn parameters gevonden in immunologische pathways zoals de PPAR pathway, IL-9 signalling en T-helper cel differentiatie. Daarnaast zijn verschillen in microbiota samenstelling gevonden, voornamelijk in het colon. In de darmmorfologie werden parameters gevonden in crypt diepte en cel proliferatie. Naast deze primaire uitkomstparameters wordt ook gekeken naar performance en de algemene gezondheidsstatus van de zeugen en de biggen als secundaire uitkomstparameters.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

De dieren worden gehouden op een praktijkbedrijf waar varkens worden gehouden voor commerciële toepassing. Dit is essentieel voor de beoogde validatie van de voerinterventie onder praktijkomstandigheden. Om de biomarkers te valideren wordt in deze validatieproef gebruik gemaakt van een bestaand contrast tussen twee groepen zeugen dat relevant is voor deze praktijktoepassing, in dit geval in de vorm van een toegelaten en geregistreerde voerinterventie met een bekend positief effect op darm-gerelateerde immuuncompetentie.
Kort voor het spenen wordt een aantal (n=160) biggen geëuthanaseerd om de biomarkers op darmniveau te bepalen. Dit is noodzakelijk omdat hierin de biomarkers zijn waargenomen in het experiment dat onder gecontroleerde condities werd uitgevoerd. Dit is niet te meten zonder de dieren te euthanaseren. Van iedere zeug wordt een beertje en een zeugje geëuthanaseerd om een bias door het geslacht te voorkomen. Uit eerder onderzoek is gebleken dat met name immunologische parameters verschillen tussen de geslachten. In de toekomst wordt gekeken of het mogelijk is om biomarkers te vinden die gemeten kunnen worden in niet-invasieve samples. In deze fase van het onderzoek is dat nog niet mogelijk. Naast de biomarkers wordt ook gekeken naar performance en gezondheid van zeugen en biggen gedurende het experiment.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.



Er is een powerberekening uitgevoerd om tot de goede sample size te komen. Hierbij is uitgegegaan van een tweezijdige t-toets. Bij de berekening van de power is uitgegaan van de parameter genexpressie omdat dit voor het onderzoek de meest relevante parameter is. Er wordt uitgegaan van een alfa van 0.05 (5%), om significante resultaten op te kunnen leveren. Er wordt uitgegaan van een middelgrote tot grote variatie in de spreiding van de resultaten. Deze aanname komt voort uit het feit dat de omstandigheden niet gecontroleerd zijn op een varkensbedrijf. Voeropname, temperatuur en huisvesting zijn minder gestandaardiseerd dan onder experimentele omstandigheden, waardoor meer spreiding wordt verwacht. Om de gewenste power van 80% te halen, is een groepsgrootte van 40 dieren nodig. De experimentele eenheid van dit experiment is de zeug omdat de voerinterventie ook in lactatievoer aanwezig is. Omdat op basis van eerdere experimenten en literatuur verwacht wordt, dat beertjes en zeugjes niet gelijk reageren, met name voor de immunologische parameters, wordt ervoor gekozen om per zeug een gemiddeld zeugje en een gemiddeld beertje te gebruiken om te compenseren voor verschil tussen de geslachten.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

De geïdentificeerde biomarkers worden gevalideerd in 160 biggen op een varkens-praktijkbedrijf. Deze biggen, 2 per toom, worden vlak voor het spenen geëuthanaseerd waarna darmmateriaal wordt afgenomen waarin de geselecteerd biomarkers kunnen worden bepaald. De keuzes voor de aantallen dieren, soort dieren en herkomst zijn allemaal gebaseerd op de behoefte om de validatie zo dicht mogelijk bij praktijkomstandigheden te houden gecombineerd met een statistische onderbouwing van minimaal benodigde aantallen om effect te kunnen meten.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☒ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging
Het is niet mogelijk om effect van voerinterventies *in vitro* na te bootsen. De darm in zijn algemeenheid en de ontwikkelende darm in het bijzonder zijn zeer complexe systemen die nog niet zijn na te bootsen onder laboratorium omstandigheden. Door de crosstalk tussen microbiota, darmepitheel en aanwezige immuuncellen ontstaat een complex netwerk van responsen dat niet buiten het dier is te bestuderen. Er is binnen het project geprobeerd (een deel van) de interventie responsen te meten in *in vitro* gekweekte epitheliale varkenscellijnen. Er was echter te weinig overlap in de *in vivo* responsen in het varken, vergeleken met de *in vitro* cellijn responsen om deze data goed te kunnen duiden.

Vermindering
Het aantal benodigde dieren in het experiment wordt bepaald door statistiek, dit om enerzijds het aantal dieren te beperken, maar tegelijkertijd wel de zekerheid te krijgen dat de gegevens die uit de het experiment komen, te gebruiken zijn om conclusies te trekken (en zo te voorkomen dat experimenten herhaald moeten worden).

Verfijning
Het aantal tijdstippen waarop bemonsterd wordt, kan op basis van eerdere ervaring onder experimentele omstandigheden, worden teruggebracht tot 1 moment.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

De verwachting is dat er geen extra pijn, lijden of angst ten gevolg van de voerinterventie wordt ondervonden. Er worden 160 dieren geëuthanaseerd. Deze

dieren zullen ten gevolge van de euthanasie gering ongerief ondervinden. De overige dieren worden gehouden als onderdeel van de commerciële productie en zullen geen aanvullend ongerief ondervinden van het experiment.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Het kan worden uitgesloten dat de geïdentificeerde biomarkers eerder zijn bestudeerd. De gekozen aanpak in de identificatie van biomarkers die correleren met voerinterventies is binnen de diervoedingssector zeer nieuw en niet eerder uitgevoerd.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☐ Nee

☒ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

De biomarkers worden gevalideerd in 160 biggen die worden gehuisvest en verzorgd op een commercieel varkensbedrijf volgens de gangbare bedrijfsvoering op dat bedrijf. Het betreft een bedrijf dat intensief samenwerkt met een van de voerproducenten in Nederland. Dit betekent dat het geldende beleid op het bedrijf niet strijdig is met het testen van voerinterventies in de praktijk. Het is voor dit validatie experiment heel belangrijk om de biomarkers te toetsen onder praktijkomstandigheden. Dat is het idee van een validatieproef. Onder experimentele omstandigheden is de interventie al op kleinere schaal getoetst. Om de gevonden resultaten te valideren is een grootschaliger experiment nodig onder omstandigheden die zo dicht mogelijk bij de praktijk staan. Dit betreft niet alleen de locatie waar de dieren gehuisvest worden, maar ook de verzorging van de dieren. Deze wordt gedaan door het personeel van de varkenshouder.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

☐ Nee > Ga verder met vraag H.

☒ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

De zeugen worden gehouden op een standaard commercieel varkensbedrijf in het Oosten van Nederland. Het betreft een veehouder met een vermeerderingsbedrijf van varkens.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

De zeugen en biggen worden gehuisvest en verzorgd op een commercieel varkensbedrijf volgens de geldende bedrijfsvoering op dat bedrijf. Het betreft een bedrijf dat intensief samenwerkt met een van de voerproducenten in Nederland. De varkenshouder heeft meerdere jaren ervaring met het testen van voerinterventies en begrijpt de manier van werken die noodzakelijk is om een onderzoek succesvol af te ronden. Dit betekent dat het geldende beleid op het bedrijf niet strijdig is met het testen van voerinterventies in de praktijk. Het is voor dit validatie experiment heel belangrijk om de voerinterventie te toetsen onder praktijkomstandigheden. Dat is het idee van een validatieproef. Onder experimentele omstandigheden is de interventie al op kleinere schaal getoetst.

Om de gevonden resultaten te valideren is een grootschaliger experiment nodig onder omstandigheden die zo dicht mogelijk bij de praktijk staan. Dit betreft niet alleen de locatie waar de dieren gehuisvest worden, maar ook de verzorging van de dieren. Deze wordt gedaan door het personeel van de veehouder.
De behandeling van de zeugen en biggen met de voerinterventie is geen handeling die onder de wet op de dierproeven valt. Het betreft een voerintervente die al is goedgekeurd voor toepassing op varkensbedrijven.
Alleen het euthanaseren van de biggen vóór het moment van spenen om darmmateriaal te kunnen bemonsteren is een activiteit / handeling die valt onder de wet op de dierproeven. Op dat moment zal dan ook één (of meer) erkende biotechnici vanuit Wageningen UR aanwezig zijn om een goede behandeling van de dieren te waarborgen. Er zullen 2 artikel 9 deskundigen bij dit project worden betrokken om een goede opzet en uitvoering van de proef te kunnen garanderen. Een deskundig onderzoeker die is aangesteld bij Wageningen UR is onder andere verantwoordelijk voor de CCD aanvraag. De tweede art. 9 deskundig is aangesteld bij de voerproducent die nauwe contacten heeft met de betreffende veehouder. Deze art. 9 deskundig zal met name verantwoordelijk zijn voor een goede uitvoering van het experiment op deze locatie.

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

☐ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☐ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De dieren die geëuthanaseerd worden, zullen hiervan beperkt ongerief ervaren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De dieren moeten worden vastgehouden en worden geprikt. Dit kan angst en pijn veroorzaken.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Deze schadelijke effecten worden zoveel mogelijk beperkt door de euthanasie zo snel mogelijk uit te voeren.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☒ Nee > Ga verder met vraag K.

☐ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van '*terminaal*', '*licht*', '*matig*' of '*ernstig*' ongerief.

licht

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Een deel van de biggen (n = 160) wordt als onderdeel van het experiment gedood vlak voor spenen. Dit is noodzakelijk om biomarkers in de darm te kunnen bepalen.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja

5

WAGENINGEN UR
For quality of life

[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Dierexperimenten
Commissie WUR

DATUM
8 februari 2016

ONDERWERP
aanvraag projectvergunning
AVD401002015330

ONS KENMERK
AVD401002015330

POSTADRES
[redacted]

BEZOEKADRES
[redacted]

INTERNET
www.wageningenUR.nl

KvK NUMMER
09098104

CONTACTPERSOON
[redacted]

TELEFOON
[redacted]

E-MAIL
DEC@wur.nl

Geachte CCD,

Onderstaand het advies dat de DEC-WUR heeft gegeven aangaande het project "Het effect van maternale voerinterventie op performance en immuuncompetentie voor het nageslacht"

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD401002015330**

2. Titel van het project: Het effect van maternale voerinterventie op performance en immuuncompetentie voor het nageslacht

3. Titel van de NTS: Bevestigen van nieuwe meetmethoden voor darmgezondheid van varkens onder praktijkomstandigheden

4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
   DEC-WUR
   [redacted]
   Secretaris: dec@wur.nl

6. Adviestraject
   Ontvangen door DEC: 28-12-2015
   Aanvraag compleet: 28-12-2015
   In vergadering besproken: 18-01-2016

7. Correspondentie met de aanvrager
   Datum vragen: 20-01-2016
   Strekking van de vragen:
   - De onderzoeker moet meer onderbouwing geven (bijv. eerder uitgevoerd onderzoek) voor de keuze van biomarkers en voerinterventies .
   - Het nu al nemen van niet-invasieve monsters (faeces, speeksel) om in te spelen op evt. vervolgonderzoek.
   - Tekstuele aanpassingen
   - De DEC heeft vragen gesteld over:
     - Extrapoleerbaarheid van de resultaten naar de praktijk
     - De statistiek
     - sexeverschillen

   Datum antwoorden: 26-01-2016

   Strekking van de antwoorden:
   - De onderzoeker heeft meer achtergrondinformatie gegeven over voorgaand onderzoek en aangegeven hoe men op basis daarvan de biomarkers en voerinterventies heeft bepaald

Wageningen UR (Wageningen University and various research institutes) is specialised in the domain of healthy food and living environment.

- Om voor evt. vervolgonderzoek te komen tot minder invasieve monstername (verfijning) zullen ook in dit project al bloed- speeksel- en faecesmonsters genomen worden.
- De tekst is aangepast conform de suggesties van de DEC.
- op vragen van de DEC:
    - Deze studie geeft een eerste indruk van de onder experimentele omstandigheden waargenomen biomarkers in de praktijk. De studie vormt daarmee een eerste stap om de gevonden experimentele resultaten te toetsen in de praktijk. Wanneer blijkt dat de resultaten niet vertaalbaar zijn naar de praktijk zal het project geen vervolg krijgen.
    - De onderliggende statistiek is duidelijker beschreven.
    - Omdat uit eerder experimenten is gebleken dat er verschillen in responsen bestaan tussen beide sexen zal van iedere toom 1 beertje en 1 zeugje ingezet worden.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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 het project uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord is.
2. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.
3. Het substantiële belang van het project, te weten: een bijdrage leveren aan het ontwikkelen van meetmethoden die darmgezondheid en weerstand kunnen meten, wordt door de DEC onderschreven.
4. De DEC stelt vast dat de expertise van de onderzoekers, de voorzieningen waar de experimenten uitgevoerd worden en de onderzoeksstrategie kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling van het project.
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: De dieren worden gehuisvest op een praktijkbedrijf. Uit de aanvraag blijkt dat dit bedrijf ervaring heeft met praktijkonderzoek. De keuze is voldoende onderbouwd vanuit de doelstelling van het onderzoek.
6. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "light" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit diverse monsternames en euthanasie.
7. De DEC heeft vastgesteld dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Er zijn nog geen alternatieven voor bepalingen op darmniveau. In dit project worden wel extra bloed- speeksel- en faecesmonsters genomen om te komen tot alternatieven die niet leiden tot vervanging maar wel tot verfijning (minder ongerief) en vermindering (dieren hoeven niet geofferd te worden en kunnen hergebruikt worden of in het reguliere productieproces blijven) van het aantal proefdieren.
8. De DEC heeft vastgesteld dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. De aanvrager beschikt over voldoende expertise om te voorkomen dat eerder gedaan onderzoek herhaald wordt.
9. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De onderzoeker heeft overwogen om euthanasie uit te voeren onder gasanesthesie zoals die in de praktijk voor castreren gebruikt wordt. De DEC is het met de onderzoeker eens dat gebruik van gasanesthesie bij deze wat zwaardere dieren voor stress zal zorgen en geen verfijning oplevert t.o.v. injectie-euthanasie. De DEC is overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
10. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.

11. 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.

D. Ethische afweging

- De DEC is in consensus mening dat het doel en de haalbaarheid van het project het gebruik van proefdieren en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan rechtvaardigt. Dit project kan een bijdrage leveren aan het ontwikkelen van nieuwe meetmethoden voor darmgezondheid die ingezet kunnen worden om diergezondheid en weerstand van de dieren te verbeteren. Dit kan uiteindelijk leiden tot een verlaging van antibioticagebruik. De uitvoering is verder niet in strijd met andere ethische overwegingen m.b.t. het gebruik van proefdieren.

E. Advies

1. Advies aan de CCD:
   - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

Met vriendelijke groet,

[redacted]

6

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)
[redacted]
Postbus 59
6700 AB WAGENINGEN

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002015330

Bijlagen
2

Datum 23 december 2015
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]
Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 27 november 2015.
Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD401002015330. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project
Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur
Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie
Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	40100
Naam instelling of organisatie:	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
KvK-nummer:	908104
Straat en huisnummer:	Akkermaalsbos 12
Postbus:	59
Postcode en plaats:	6700AB WAGENINGEN
IBAN:	NL10RABO0397066465
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	Wageningen UR

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:	[redacted]
Functie:	Onderzoeker
Afdeling:	[redacted]
Telefoonnummer:	[redacted]
E-mailadres:	[redacted]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Afdeling:	[redacted]
Telefoonnummer:	[redacted]
E-mailadres:	[redacted]

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?	[x] Nieuwe aanvraag [ ] Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn [ ] Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum:	14 februari 2016
Geplande einddatum:	31 december 2016
Titel project:	Validatie van biomarkers voor immuun competentie in biggen onder praktijk omstandigheden
Titel niet-technische samenvatting:	Bevestigen van nieuwe meetmethoden voor darmgezondheid van varkens onder praktijkomstandigheden
Naam DEC:	DEC Wageningen UR
Postadres DEC:	Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen
E-mailadres DEC:	DEC@wur.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen:	€ 468,-
De leges voldoet u:	na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:	[x] Projectvoorstel [x] Beschrijving Dierproeven [x] Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Plaats:	Wageningen
Datum:	21 december 2015

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)
[redacted]
Postbus 59
6700 AB WAGENINGEN

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002015330

Bijlagen
2

Datum 23 december 2015
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 23 december 2015
Vervaldatum: 22 januari 2016
Factuurnummer: 15700330
Ordernummer: WUR921845

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD401002015330	€ 468,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

8

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)
[redacted]
Postbus 59
6700 AB WAGENINGEN

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002015330

Datum 22 FEB 2016
Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]
Op 27 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Validatie van biomarkers voor immuun competentie in biggen onder praktijk omstandigheden" met aanvraagnummer AVD401002015330. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 8 februari 2016 heeft u uw aanvraag gewijzigd. Er is, tezamen met het DEC-advies, een nieuw projectvoorstel, NTS en Bijlage Dierproeven gestuurd.

Beslissing
Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). U kunt met uw project "Validatie van biomarkers voor immuun competentie in biggen onder praktijk omstandigheden" starten. De vergunning wordt afgegeven van 22 februari 2016 tot en met 31 december 2016.

Procedure
Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. Dit advies is opgesteld op 8 februari 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.
Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.
Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

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 20401, 2500 EK 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. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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

Meer informatie
Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:
[redacted]
ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:
- Vergunning
  Hiervan deel uitmakend:
  - DEC-advies
  - Weergave wet- en regelgeving

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)
Adres:	Postbus 59
Postcode en plaats:	6700AB WAGENINGEN
Deelnemersnummer:	40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 22 februari 2016 tot en met 31 december 2016, voor het project "Validatie van biomarkers voor immuun competentie in biggen onder praktijk omstandigheden" met aanvraagnummer AVD401002015330, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 27 november 2015
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 8 februari 2015;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 8 februari 2015;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 8 februari 2016, ontvangen op 8 februari 2016.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 8 februari 2016

Naam proef	**Diersoort/ Stam**	**Aantal dieren**	**Ernst**	**Opmerkingen**
Validatie van biomarkers voor immuun competentie en darmgezondheid in biggen onder praktijk omstandigheden	Varkens (Sus scrofa domesticus) / biggen, vlak voor het spenen	160	Licht / mild	

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. Uit artikel 10b 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 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.
Artikel 10b schrijft 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 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 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 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 13d 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 13c 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.
De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

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).

[redacted]

Van: Info-zbo
Verzonden: vrijdag 26 februari 2016 11:41
Aan: 'DEC'
Onderwerp: Terugkoppeling AVD401002015330

Geachte DEC WUR,
Op 27 november 2015 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project "Validatie van biomarkers voor immuun competentie in biggen onder praktijk omstandigheden" met aanvraagnummer AVD401002015330.

De CCD heeft de aanvrager geen aanvullende vragen gesteld.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,
Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)
E: info@zbo-ccd.nl

	Inventaris Wob-verzoek W16-11S								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**document**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
	NTS2015331								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel oud			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven oud			x					
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
8	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
9	Projectvoorstel herzien			x					
10	Bijlage beschrijving dierproeven herzien			x					
11	Mails vragen antwoorden DEC 16-2-2016				x		x	x	
12	Advies CCD		x						x
13	Beschikking en vergunning				x		x	x	
14	Mail beschikking 23-2-2016				x		x	x	

1

Centrale Commissie Dierproeven

22 DEC 2015

AVD 401002015331

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.centralecommissiedierproeven.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.

☒ Ja > *Vul uw deelnemernummer in* 40100
☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]	
KvK-nummer	908104	
Straat en huisnummer	Akkermaalsbos	12
Postbus	59	
Postcode en plaats	6700AB	Wageningen
IBAN	NL10RABO0397066465	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR	

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.

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	☐ Dhr. ☒ Mw.
Functie	Onderzoeker	
Afdeling	[redacted]	
Telefoonnummer	[redacted]	
E-mailadres	[redacted]	

1.5 *(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	☒ Dhr. ☐ Mw.
Functie	Onderzoeker	
Afdeling	[redacted]	
Telefoonnummer	[redacted]	
E-mailadres	[redacted]	

1.6	*(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.	(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
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
		☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
2.2	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
2.3	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 einddatum van het project?	Startdatum	01 - 1 - 2016
		Einddatum	31 - 12 - 2016
3.2	Wat is de titel van het project?	Competitieve exclusie flora in landbouwhuisdieren om antimicrobiële resistente bacteriën te reduceren	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Een methode om antibioticum resistentie in landbouwhuisdieren te verminderen	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC Wageningen UR
		Postadres	Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen
		E-mailadres	dec@wur.nl

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741 Lege

☐ Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
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.

☐ Via een eenmalige incasso

☐ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel + bijlage Beschryving dierproeven

☒ Niet-technische samenvatting

☒ DEC-advies

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

☒ Bestelorder WUR 921842

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:

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- 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.
- 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	[redacted]
Functie	[redacted]
Plaats	Wageningen
Datum	18 - 12 - 2015
Handtekening	[redacted]

Format

Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.zbo.ccd.nl

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	40100
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek

1.3 Vul de titel van het project in.	Competitieve exclusie flora in landbouwhuisdieren om antimicrobiële resistente bacteriën te reduceren.

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

In dit project wordt gekeken of de techniek van competitieve exclusie flora (CEF) geschikt is om de aantallen antimicrobiële resistentiegenen die voorkomen in de darm van kippen terug te dringen. De darm zit vol met bacteriën, waaronder ook veel bacteriën die antimicrobiële resistentiegenen bevatten. De kolonisatie van de darm met bacteriën, begint onmiddellijk na uitkomst van het kuiken uit het ei met de bacteriën die in de omgeving aanwezig zijn. Deze eerste kolonisatie is mede bepalend voor de microbioom samenstelling en diversiteit op latere leeftijd, inclusief het vóórkomen van antimicrobiële resistentiegenen. Het idee van CEF is de darm in dit bepalende stadium van de kolonisatie, op heel jonge leeftijd, te koloniseren met een stabiele, evenwichtige populatie van bacteriën die vrij zijn van antimicrobiële

resistentie genen. Deze donor-populatie zal afkomstig zijn van donor-kippen met Specific Pathogen Free (SPF) status. Dit koppel dieren wordt sinds de begin 90-er jaren in isolatie gefokt, en heeft nooit antibiotica toegediend gekregen. Hierdoor is de verwachting dat dit koppel kippen zeer lage aantallen resistentiegenen in de darm draagt. Door deze donor-populatie op heel jonge leeftijd toe te dienen, wordt het kuiken gekoloniseerd met een populatie bacteriën die vrij zijn van antimicrobiële resistentie genen. Deze 'schone' donor- populatie koloniseert de hele darm van de kuikens waardoor er geen ruimte meer beschikbaar is voor bacteriën die wel antimicrobiële resistentiegenen bevatten. De donor-populatie competeert met de bacteriën die antimicrobiële resistentiegenen bevatten. Dit is het principe van competitieve exclusie flora.

Het principe van competitieve exclusie flora (CEF) wordt in de pluimveehouderij al met succes toegepast. Het doel is hierbij niet de reductie van antimicrobiële resistentiegenen, maar het terugdringen van het aantal pathogenen in de darm om (latere) infecties te voorkomen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van het microbioom van gezonde volwassen kippen. Dit wordt op jonge leeftijd aan kuikens toegediend om bijvoorbeeld infecties met *Clostridium perfringens* (1) of Salmonella (2) te voorkomen. Daarnaast worden commerciële producten als Aviguard en Broilact breed ingezet bij eendagskuikens om ze te beschermen tegen pathogenen. Deze producten bevatten flora afkomstig van gezonde kippen, en worden als spray in kippenstallen toegediend, en leiden vervolgens tot een reductie van pathogenen. In de literatuur is veel aandacht besteed aan het anaerobe karakter van de donor-microflora. Voor veel bacteriën geldt dat blootstelling aan zuurstof toxisch is. Goren *et al.* (2, 3) hebben hier veel experimenten aan geweid en toediening via spray, drinkwater en direct orale toediening met een kropnaald met elkaar vergeleken. Toediening in drinkwater is geen geschikte methode, hierbij overleeft het merendeel van de microbiota niet. Hoewel directe orale toediening met een kropnaald beter lijkt te werken dan spray toediening, geven beide toedieningsmethoden een significante reductie van het aantal pathogenen in de darm (2, 3). Voorwaarde hierbij is dat de isolatie en opwerking van de donor-microflora gebeurt in een anaerobe kast.

Op basis van het succes van CEF op reductie van het aantal pathogenen in de kippendarm, wordt in dit project gekeken of met behulp van CEF een bijdrage kan worden geleverd aan de reductie van het aantal antimicrobiële resistentiegenen in de kippendarm.

De snelle toename van antimicrobiële resistentie van bacteriën die in mensen en/of dieren voorkomen, is een wereldwijd toenemend probleem. Methicilline resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) en de 'extended spectrum β-lactamase (ESBL) producerende bacteriën' zijn de meest bekende resistente bacteriën. MRSA komt vooral voor in omgevingen waar veel antibiotica worden gebruikt, zoals verpleeghuizen, ziekenhuizen en in de intensieve veehouderij. Overdracht van resistente bacteriën van dieren naar mensen vormt een ernstige bedreiging voor de volksgezondheid (ref. 4-7). De prevalentie van MRSA in varkens en vlees kalveren kan oplopen tot 75%. Alle vleeskuikenbedrijven zijn positief voor ESBL en 94% van de kipproducten in de winkel is besmet met ESBL producerende bacteriën. Het huidige beleid van het ministerie van Economische Zaken is gericht op een sterke reductie van het gebruik van antibiotica in de veehouderij. Dankzij dit streng antibioticum beleid raakt in Nederland ongeveer 1 procent van de ziekenhuispatiënten met de MRSA bacterie besmet, tegen 20 – 50% van de patiënten in buitenlandse ziekenhuizen. Het doel van dit project is het aantal anti-microbiële resistentie genen in de kippenhouderij verder te reduceren door toepassing van CEF.

Hiertoe wordt als eerste een donor-microflora bereid. Hiervoor worden SPF kippen gebruikt die nog nooit zijn behandeld met antibiotica. De microflora van deze kippen wordt gescreend op het aantal antimicrobiële resistentiegenen met behulp van een bestaande microarray. Deze microarray bevat alle tot nu toe beschreven resistentiegenen, en kan gebruikt worden om aantallen en soorten antimicrobiële resistentiegenen in een populatie te karakteriseren. Het aantal antimicrobiële resistentiegenen dat aanwezig is in deze SPF-kippen wordt vergeleken met het aantal antimicrobiële genen dat aanwezig is in praktijkkippen uit de pluimveehouderij. Er moet een groot, significant verschil in aantal antimicrobiële resistentiegenen zijn tussen deze beide kippen-populaties om CEF te kunnen uitvoeren. Als dit het geval is, wordt donor-micoflora bereidt uit de SPF kippen volgens de methode die Goren beschrijft. Hierbij wordt de microflora geoogst in een anaerobe kast en tot gebruik anaeroob opgeslagen. Voor de ontvangende dieren wordt een koppel kippen geselecteerd met relatief hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen. Eendagskuikens afkomstig van dit bedrijf zullen als ontvanger dienen voor de competitieve exclusie studie. Dit koppel wordt geselecteerd met behulp van de microarray.

1. Kaldhusdal M. et al. 2001. Reduced incidence of *Clostridium perfringens*-associated lesions and improved performance in broiler chickens treated with normal intestinal bacteria from adult fowl. Avian Dis. 45(1):149-56.

2. Goren E. et al. 1988. Reduction of salmonella infection of broilers by spray application of intestinal microflora: A longitudinal study by spray application of intestinal microflora. Vet. Q. 10:4, 249-255.

3. Goren E. et al. 1984. Protection of chicks against salmonella infection induced by spray application of intestinal microflora in the hatchery. Vet. Q. 6(2):73-79.

4. Leverstein-van Hall MA et al. 2011. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. Clin Microbiol Infec 17:873-880.

5. Overdevest I et al. 2011. Extended-Spectrum beta-Lactamase Genes of Escherichia coli in Chicken Meat and Humans, the Netherlands. Emerg Infect Dis 17:1216-1222.

6. van Loo I et al. 2007. Emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus of animal origin in humans. Emerg Infect Dis 13:1834-1839.

7. Voss A et al. 2005. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pig farming. Emerg Infect Dis 11:1965-1966.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Beschrijf de **algemene doelstelling** en haalbaarheid van het project.

Het doel van dit onderzoek is om proof of concept te leveren voor een nieuwe methode om de hoeveelheden antimicrobiële resistentiegenen in de darm van kippen te reduceren. Deze onderzoeksvraag komt voort uit de wettelijke taken die de Nederlandse overheid heeft belegd om in de veehouderij het aantal anti-microbiële resistentiegenen te reduceren om zo verspreiding van antimicrobiële resistente bacteriën naar de mens te verminderen. De nieuwe methode bestaat uit het toepassen van een specifieke vorm van het competitive exclusion flora (CEF) principe. In deze studie wordt gekeken of CEF werkt om het aantal antimicrobiële resistentiegenen in de kippendarm te reduceren.

Beschrijf de algemene doelstelling en **haalbaarheid** van het project.

De haalbaarheid van dit project wordt positief ingeschat. De methode van CEF wordt met succes toegepast voor de reductie van ziekteverwekkers. Technisch is het project dan ook goed haalbaar op basis van beschikbare methoden in de literatuur. De grootste uitdaging met betrekking tot de haalbaarheid zit in het verzamelen van geschikt donor materiaal. Wanneer blijkt dat ook de SPF kippen hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen bij zich dragen, is het niet mogelijk de studie uit te voeren.

3.3 Belang

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

Het belang van dit project is dat CEF een nieuwe methode zou kunnen zijn om het aantal antimicrobiële resistentiegenen in de pluimveehouderij te reduceren. Reductie van antibioticum resistentie is een belangrijk speerpunt van de overheid om te voorkomen dat antimicrobiële resistente organismen de mens kunnen infecteren. Hiermee is het maatschappelijke belang het voorkomen van humane infecties met antimicrobiële resistente bacteriën.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

De volgende stappen moeten genomen worden:

1. **Selectie van pluimveebedrijf voor levering van microbiota-donoren**
2. **Selectie van pluimveebedrijf voor levering van microbiota-ontvangers**
3. **Proof of concept studie in kuikens**

Ad 1. Selectie van kippenbedrijf voor levering van microbiota-donoren

De eerste fase van het project bestaat uit screening van de microflora van SPF-donorkippen. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van een bestaande microarray die alle bekende overdraagbare antimicrobiële resistentiegenen bevat. Hiermee kan gekeken worden naar de aantallen en de soorten antimicrobiële resistentiegenen die in de SPF kippen aanwezig zijn. Hiertoe worden kippen in de leeftijd van 3 – 6 weken, opgekocht en geëuthanaseerd waarna in de caeca wordt gekeken naar het aantal antimicrobiële resistentiegenen. Er wordt gekozen naar de caeca te kijken omdat daar de diversiteit van bacteriën het grootst is. De aantallen antimicrobiële resistentiegenen in SPF-kippen worden vergeleken met de aantallen antimicrobiële resistentiegenen van kippen uit de reguliere pluimveehouderij. De aantallen antimicrobiële resistentiegenen moeten significant lager zijn in de SPF donorkippen om de CEF strategie te kunnen laten werken. Als dit niet het geval is, betekent dit een NO GO voor het project.

Ad 2. Selectie van kippenbedrijf voor levering van microbiota-ontvangers

Een (regulier) vleeskuikenbedrijf met dieren met hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen wordt geselecteerd als ontvanger van de CEF therapie. Hiervoor

wordt in eerste instantie gebruik gemaakt van de routinematige screening van kippen op slachtleeftijd. Bij deze screening wordt gekeken naar resistentie van de indicator organismen. Op basis van deze routinematige screening worden bedrijven geselecteerd met hoge aantallen resistentie indicator organismen. Vervolgens wordt met behulp van de microarray gekeken welke bedrijven de hoogste aantallen antimicrobiële resistentiegenen laten zien. Eendagskuikens afkomstig van het geselecteerde bedrijf worden ontvanger voor de proof of concept studie.

Ad 3. Proof of concept studie in kippen

Met de geselecteerde donorkippen en ontvanger kippen, wordt vervolgens een proof of concept studie uitgevoerd. Hiertoe worden 25 donorkippen van het geselecteerde bedrijf opgekocht. Deze worden geëuthanaseerd in een anaerobe kast. Dit is zeer belangrijk omdat een groot deel van de microbiota strikt anaeroob is, en niet tegen zuurstof kan. In deze anaerobe kast wordt darminhoud van de kippen verzameld. Vervolgens wordt dit materiaal toegediend aan de ontvangende eendagskuikens met behulp van een kropnaald. De controlegroep ontvangt fysiologisch zout zonder donor-microflora. Het doel van de studie is om te bepalen of door toediening van de schone CEF het aantal antimicrobiële resistentiegenen in de CEF groep lager is dan in de controlegroep. Om dit vast te stellen worden als functie van de tijd in beide groepen kippen geëuthanaseerd om te kijken naar de aantallen antimicrobiële resistentiegenen in verschillende darmdelen (jejunum & caecum).

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

Voor het bepalen van het aantal antimicrobiële resistentiegenen in de darm van SPF kippen wordt een aantal (max. 5) kippen geëuthanaseerd om de darm te kunnen bemonsteren. Als de screening aangeeft dat het aantal antimicrobiële resistentiegenen significant lager is in deze SPF kippen dan in de ontvangende kippen, worden vervolgens maximaal 25 kippen geëuthanaseerd om de donor-microflora te verzamelen.

Voor de proof of concept studie worden eendagskuikens afkomstig van een bedrijf met hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen in twee groepen verdeeld. De ene groep vormt de controlegroep, de andere groep wordt behandeld met een donor microbiota mengsel. Dit wordt oraal toegediend met behulp van een kropnaald. Vervolgens wordt de samenstelling van de microbiota in de darm van beide groepen vervolgd als functie van de tijd. Hiertoe worden op een aantal tijdstippen kuikens uit de proef genomen en geëuthanaseerd om monsters van de darminhoud te kunnen nemen. Alle kippen worden op een aantal tijdstippen bemonsterd door middel van een feces swab. Alle monstermaterialen worden gebruikt om de aantallen antimicrobiële resistentiegenen (resistoom) te bepalen/meten.

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

Het aantal antimicrobiële resistentiegenen dat aanwezig is in de darm van de SPF donor-kippen is cruciaal voor de uitvoering van het project. Wanneer deze aantallen niet significant lager zijn dan de aantallen antimicrobiële resistentiegenen van pratkijkdieren is dat een NO GO voor het project. Na de selectie van donor-kippen en ontvanger-kippen kan de proof of concept studie worden uitgevoerd.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.	
Volgnummer	Type dierproef
1	Effect van ‘competitive exclusion flora’ op aantallen antimicrobiële resistentie genen in de darm van kippen
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Bijlage
Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	40100
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 1 Type dierproef: Effect van 'competitive exclusion flora' op aantallen antimicrobiële resistentie genen in de darm van kippen

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

In de pluimveesector komen grote aantallen antimicrobiële resistentie genen voor. Het grootste aantal antimicrobiële resistentiegenen is aanwezig in de darm van dieren. De darm is hierdoor een aantrekkelijk doelwit voor methoden die de reductie van het aantal antimicrobiële resistentiegenen nastreven. Het doel van het hier beschreven experiment is proof of concept te leveren voor een nieuwe methode om het aantal antimicrobiële resistentie genen in de darm van pluimvee te verlagen. In dit onderzoek wordt geprobeerd de darm van kuikens op zeer jonge leeftijd te koloniseren met een SPF donor-microflora waar lage aantallen antimicrobiële resistentiegenen in aanwezig zijn. We verwachten dat hierdoor minder plaats vrij is in de darm voor micro-organismen mét antimicrobiële resistentiegenen. Dit principe wordt 'competitive exclusion flora' (CEF) genoemd. Dit principe wordt al toegepast in de pluimveehouderij om kolonisatie door ziekteverwekkers te voorkomen en/of te reduceren. Het is nog niet eerder onderzocht of het principe ook werkt om het aantal antimicrobiële resistentiegenen te verminderen. Dat is de vraagstelling van het hier beschreven experiment. Het experiment heeft ontvangende kuikens, die op zeer jonge leeftijd behandeld worden met SPF donor microflora waar lage aantallen antimicrobiële resistentiegenen in aanwezig zijn. De ontvangende conventionele

kuikens zijn afkomstig van een “gewone” commerciële broederij waar kippen hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen in de darm hebben, zodat het effect van de behandeling goed gemeten kan worden.

Om vast te stellen of de microflora van SPF-kippen geschikt is als donor-microflora, wordt de darm van de SPF kippen gescreend op het aantal antimicrobiële resistentiegenen. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van een bestaande microarray die alle bekende overdraagbare antimicrobiële resistentiegenen bevat. Hiermee kan gekeken worden naar de aantallen en de soorten antimicrobiële resistentiegenen die in de SPF kippen aanwezig zijn. Hiertoe worden kippen in de leeftijd van 3 – 6 weken, opgekocht en geëuthanaseerd waarna in de caeca wordt gekeken naar het aantal antimicrobiële resistentiegenen. Er wordt gekozen om naar de caeca te kijken omdat daar de diversiteit van bacteriën het grootst is. De aantallen antimicrobiële resistentiegenen in SPF-kippen worden vergeleken met de aantallen antimicrobiële resistentiegenen van kippen uit de reguliere pluimveehouderij. Om dit materiaal te verkrijgen, hoeven geen kippen te worden geëuthanaseerd. In de pluimveehouderij worden op reguliere basis caeca verzameld voor routinediagnostiek. Deze kunnen worden gebruikt voor de screening. De aantallen antimicrobiële resistentiegenen in SPF donorkippen moeten significant lager zijn dan in de praktijkdieren, om de CEF strategie te kunnen laten werken. Als dit niet het geval is, betekent dit een NO GO voor het project.

Als dit wel het geval is, worden 25 SPF-kippen gekocht voor het oogsten van de donor microflora. Deze kippen worden geëuthanaseerd en de darminhoud wordt verzameld. Dit gebeurt in een anaerobe kast, omdat veel van de bacteriën strikt anaeroob zijn en doodgaan zodra er zuurstof bij komt. De SPF donor microflora wordt ingevroren met glycerol om de bacteriën te “conserveren”.

Voor de proof of concept studie wordt voor een eenvoudige proefopzet gekozen. Er worden 160 eendagskuikens aangekocht op de geselecteerde broederij met hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen, die na aankomst in twee groepen worden verdeeld. De behandelgroep wordt direct na aankomst behandeld met de SPF donor microflora. Dit wordt oraal toegediend aan de individuele kuikens met behulp van een kropnaald. De controle groep krijgt op hetzelfde tijdstip een orale toediening van fysiologisch zout zonder microflora. De behandeling met SPF donor microflora wordt dagelijks herhaald gedurende 1 week. Vervolgens worden de kippen in de tijd vervolgd. Op 4 tijdstippen worden kuikens geëuthanaseerd om de aantallen antimicrobiële resistentiegenen in de darm te bepalen. De dieren worden gedurende het experiment onder standaard experimentele omstandigheden gehuisvest, waarbij de behandelgroep en controlegroep strikt van elkaar gescheiden worden.
Wanneer blijkt dat de kuikens onverwacht slecht reageren op de SPF donor microflora, wordt dit beschouwd als een no go voor het project. Een sterke verslechtering van de kuikens wordt als humaan eindpunt beschouwd en als no go moment voor de verdere voortgang van dit project.

De primaire uitleesparameter van deze proef is “Aantallen antimicrobiële resistentiegenen in de darminhoud in het jejunum en in het caecum”. Dit wordt bepaald door gebruik te maken van de speciaal hiervoor ontwikkelde microarray waarmee resistentiegenen gedetecteerd en gekwantificeerd kunnen worden.

Daarnaast wordt ook gekeken naar de microbiële samenstelling van de microbiota in de darminhoud in het jejunum en in het caecum en naar de algemene gezondheid van de kippen. Dit zijn echter geen primaire uitleesparameters.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Voorafgaand aan het experiment, worden 5 SPF kippen geëuthanaseerd om het aantal antimicrobiële resistentiegenen in de darm vast te stellen.

Wanneer de aantallen antimicrobiële resistentiegenen significant lager zijn dan de aantallen antimicrobiële resistentiegenen in kippen van een regulier pluimveebedrijf, worden de kippen geschikt bevonden als SPF donor voor microflora. Om deze microflora te oogsten, worden 25 SPF kippen geëuthanaseerd en de darminhoud verzameld.

160 eendagskuikens van een geselecteerde broedrij met hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen worden aangekocht. Dit betreft conventionele Ross en/of Cobb kuikens die worden verdeeld in twee groepen van 80: een behandelgroep en een controlegroep. Beide groepen worden onder standaard experimentele omstandigheden gehuisvest in groepen. Eén dag na uitkomst worden beide groepen behandeld. De behandelgroep krijgt oraal SPF donor microflora toegediend met behulp van een kropnaald, terwijl de controlegroep op dezelfde wijze fysiologisch zout krijgt toegediend. Deze behandeling wordt dagelijks herhaald gedurende 1 week. Beide groepen worden vanaf dit moment strikt gescheiden om te voorkomen dat de orale SPF donor microflora via fecale besmetting ook in de controlegroep terecht komt. De kippen worden verder onder standaard omstandigheden gehouden. Als functie van de tijd worden kippen geëuthanaseerd om het aantal antimicrobiële resistentiegenen in de darm te bepalen. Op 2, 7, 14 en 21 dagen na uitkomst, worden 20 kippen geëuthanaseerd waarna ingesta van jejunum en caecum wordt verzameld.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

We zijn op zoek naar statistisch significante veranderingen in aantallen antimicrobiële resistentiegenen. Dit is een complexe uitleesparameter, die op voorhand niet gemakkelijk in getallen uit te drukken is. Voor een statistische berekening van het aantal benodigde dieren is een reële inschatting nodig van het verwachte effect. Die inschatting is erg lastig. Uit eerdere experimenten waarin is gekeken naar de samenstelling van microbiota in de darm, is gebleken dat er variatie is tussen individuen, waardoor grotere groepen noodzakelijk zijn om effect te kunnen meten. Uit een recent experiment in varkens is gebleken dat een groepsgrootte van 20 dieren voldoende is om deze variatie op te vangen en toch middelgrote effecten waar te nemen. Omdat we in dit experiment niet op zoek zijn naar een kleine verschuiving in samenstelling, maar in relatief grote veranderingen in het aantal resistentiegenen is ook in deze studie gekozen voor een groepsgrootte van 20 dieren per tijdstip.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Voor dit project zijn nodig:

- Maximaal 5 volwassen SPF kippen worden geëuthanaseerd om te bepalen hoeveel antimicrobiële resistentiegenen in de darm aanwezig zijn.
- Maximaal 25 volwassen SPF kippen worden geëuthanaseerd en gebruikt als SPF donor voor de microflora.
- 160 eendagskuikens afkomstig van een pluimveebedrijf met hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen worden gebruikt voor de proof of concept studie. Het is belangrijk dat deze dieren zo jong zijn omdat het ontwikkelen van een stabiele microbiota onmiddellijk na uitkomst begint. Hoe eerder

de interventie wordt gepleegd, hoe groter het effect hiervan op de latere microflora zal zijn.

De eendagskuikens zijn afkomstig van een pluimveebedrijf met hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen. Dit is gebaseerd op de screening vooraf. Er wordt vervolgens vanuit gegaan dat deze screening representatief is voor de eendagskuikens afkomstig van dit bedrijf. Op basis van ervaring verkregen door de routinematige screening van bedrijven op het voorkomen van antimicrobiële resistente micro-organismen is dit terecht. Uit deze screening blijkt inderdaad dat bedrijven in de tijd vergelijkbare aantallen antimicrobiële resistentiegenen bij zich dragen. Omdat in de proef gebruik wordt gemaakt van eendagskuikens is het niet mogelijk om voorafgaand aan het experiment te controleren of deze kuikens inderdaad hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen bij zich dragen. Dat betekent dat het theoretisch mogelijk is dat, ondanks zorgvuldige selectie vooraf, de eendagskuikens minder antimicrobiële resistentiegenen bij zich dragen dan gewenst voor het experiment. Als dit in praktijk zo blijkt te zijn, kan geen proof of concept geleverd worden. Daarom houden we er in het project rekening mee dat de proef wellicht twee keer moet worden uitgevoerd.
Als blijkt dat de screening, geen eendagskuikens met hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen oplevert, moet de proefopzet worden aangepast. In dat geval kan mest van het aanleverende pluimveebedrijf worden ingebracht in de stal om de kuikens extra bloot te stellen aan de hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen. Dit is een extra parameter in de proefopzet, waar op voorhand niet voor gekozen wordt om niet onnodige variatie te introduceren. Wanneer dit echter nodig blijkt, zal voor deze extra parameter worden gekozen.

Dat betekent dat in totaal maximaal 30 volwassen SPF kippen en maximaal 320 eendagskuikens van een pluimveebedrijf gebruikt zullen worden.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☒ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging
Het onderzoek naar surveillance en terugdringen van resistente organismen binnen de veehouderij is een beleidsmatig voorgeschreven taak die wordt uitgevoerd door verschillende partijen. De dynamiek van aantallen antimicrobiële resistentiegenen die aanwezig zijn in de microflora, kan niet bestudeerd worden zonder daarvoor proefdieren te gebruiken omdat de ingewikkelde relatie tussen de gastheer en microflora *in vitro* niet is na te bootsen. Celkweken die bestaan uit meerdere celtypes zoals die vóórkomen in de darm zijn technisch niet haalbaar. Het grootste deel van de darmbacteriën is *in vitro* nog niet te kweken. De interactie tussen deze twee complexe systemen nabootsen *in vitro* is daarmee onmogelijk met de huidige stand van technische ontwikkelingen.
Vermindering
De groepsgroottes zijn zo beperkt mogelijk gehouden.

Verfijning
Dieren worden gehuisvest in groepshuisvesting op vaste vloeren met strooisel en krijgen beschikking over een zitstok.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

De orale toediening met een kropnaald is eenvoudig en er is veel ervaring mee. Toch kan deze toediening zorgen voor pijn, stress en angst. De overige monsternames worden gedaan na euthanasie van de kippen. De euthanasie zelf zal kortdurend pijn, stress en angst opleveren. Op basis van literatuur en ervaring wordt niet verwacht dat de dieren ongerief ondervinden van de SPF donor microflora. Het valt echter ook niet volledig uit te sluiten. Daarom worden humane eindpunten gehanteerd wanner de kippen onverwacht een sterke achteruitgang hebben van hun algemene gezondheid.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Op basis van een literatuur studie en uitgebreide kennis van het veld van verschillende experts wordt gedacht dat deze studies niet eerder (elders) zijn uitgevoerd. Duplicatie is niet noodzakelijk.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☒ Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

☐ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☐ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De orale toediening met een kropnaald is eenvoudig en er is veel ervaring mee. Toch kan deze toediening zorgen voor pijn, stress en angst. De overige monsternames worden gedaan na euthanasie van de kippen. De euthanasie zelf zal kortdurend pijn, stress en angst opleveren. Op basis van literatuur en ervaring wordt niet verwacht dat de dieren ongerief ondervinden van de SPF donor microflora. Het valt echter ook niet volledig uit te sluiten. Daarom worden humane eindpunten gehanteerd wanneer de kippen onverwacht een sterke achteruitgang hebben van hun algemene gezondheid.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het beschreven ongerief wordt veroorzaakt door de toediening van de behandeling.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

De behandeling is eenmalig, voor monstername worden de dieren geëuthanaseerd.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Hoewel niet verwacht wordt dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is, valt niet volledig uit te sluiten dat de kippen een extreme reactie geven op de SPF donor microflora. Hierbij valt bijvoorbeeld te denken aan een heftige infectie in de darm die eventueel ook systemisch kan worden. Op basis van ervaring en literatuur wordt de kans hierop als beperkt ingeschat. Mochten de kippen een onverwachte sterke achteruitgang laten zien die duidt op een mogelijke infectie, dan wordt dit beschouwd als een humaan eindpunt. Daarnaast wordt dit beschouwd als een No Go voor dit project.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

Dit risico betreft de helft van de eendagskuikens in de proef (n = 80), namelijk de kuikens die de SPF donor microflora ontvangen. De controlekuikens lopen dit risico niet.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van '*terminaal*', *'licht'*, *'matig'* of *'ernstig'* ongerief.

licht

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Tijdens de proef worden kippen als functie van de tijd bemonsterd. De primaire uitleesparameters van de proef bestaan uit analyses aan de ingesta van jejunum en caecum. Deze materialen zijn niet in voldoende hoeveelheid en op etische wijze te verkrijgen zonder de kippen te doden.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja

5

WAGENINGEN UR
For quality of life

[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Dierexperimenten
Commissie WUR

DATUM
27 januari 2016

ONDERWERP
aanvraag projectvergunning
AVD401002015331

ONS KENMERK
AVD401002015331

POSTADRES
[redacted]

BEZOEKADRES
[redacted]

INTERNET
www.wageningenUR.nl

KvK NUMMER
09098104

CONTACTPERSOON
[redacted]

TELEFOON
[redacted]

E-MAIL
DEC@wur.nl

Geachte CCD,

Onderstaand het advies dat de DEC-WUR heeft gegeven aangaande het project "Competitieve exclusie flora in landbouwhuisdieren om antimicrobiële resistente bacteriën te reduceren"

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD401002015331**
2. Titel van het project: Competitieve exclusie flora in landbouwhuisdieren om antimicrobiële resistente bacteriën te reduceren
3. Titel van de NTS: Een methode om antibioticum resistentie in landbouwhuisdieren te verminderen
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
   DEC-WUR
   [redacted]
   Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
   Ontvangen door DEC: 12-01-2016 (23 en 28-12-2015 heeft de CCD al gestuurd maar is toen beide keren niet ontvangen)
   Aanvraag compleet: 28-12-2015
   In vergadering besproken: 18-01-2016

Wageningen UR (Wageningen University and various research institutes) is specialised in the domain of healthy food and living environment.

7. Correspondentie met de aanvrager
   Datum vragen: 19-01-2016
   Strekking van de vragen:
   - Redactionele aanpassingen
   - De DEC heeft vragen gesteld over:
     - De tijdstippen van monstername en doet de onderzoeker de suggestie om ook op een tijdstip vlak voor het slachten een bepaling uit te voeren

   Datum antwoorden: 21-01-2016

   Strekking van de antwoorden:
   - De redactionele opmerkingen van de DEC zijn gecorrigeerd
   - op vragen van de DEC:
     - De onderzoeker neemt de suggestie van de DEC over en heeft een optionele monstername op 42 dagen toegevoegd

   De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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 het project uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord is.
2. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.
3. Het substantiële belang van het project, te weten het ontwikkelen van een methode die antimicrobiële resistentiegenen in de pluimveehouderij zou kunnen reduceren waardoor een afname van antibiotica-resistentie kan optreden , wordt door de DEC onderschreven.
4. De DEC stelt vast dat de expertise van de onderzoekers, de voorzieningen waar de experimenten uitgevoerd worden en de onderzoeksstrategie kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling van het project.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "light" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit orale toediening m.b.v. een kropnaald en euthanasie.
7. De DEC heeft vastgesteld dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Er zijn geen dierproefvrije modellen beschikbaar waarin de te onderzoeken resistente bacteriën gekweekt kunnen worden. Ook de relatie tussen gastheer en microflora is niet *in vitro* na te bootsen.
8. De DEC heeft vastgesteld dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. De onderzoeker heeft het aantal benodigde dieren bepaald aan de hand van soortgelijk onderzoek in varkens. De aanvrager beschikt over voldoende expertise om te voorkomen dat eerder gedaan onderzoek herhaald wordt.
9. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De dieren worden gehouden in grondhokken op strooisel. De DEC is overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
10. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
11. 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.

D. Ethische afweging

- De DEC is in consensus van mening dat het doel en de haalbaarheid van het project het gebruik van proefdieren en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan rechtvaardigt. Dit project kan een bijdrage leveren aan een vermindering van antibioticaresistente bacteriën. Dit kan leiden tot een afname van antibioticagebruik. Dit is vooral voor de mens van belang (de kippen zelf worden immers niet ziek van deze bacteriën). De uitvoering is verder niet in strijd met andere ethische overwegingen m.b.t. het gebruik van proefdieren.

E. Advies

1. Advies aan de CCD:
   - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

Met vriendelijke groet,

[redacted]

6

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)
[redacted]
Postbus 59
6700 AB WAGENINGEN

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002015331

Bijlagen
2

Datum 22 december 2015
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],
Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 21 december 2015.
Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD401002015331. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project
Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur
Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie
Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	40100
Naam instelling of organisatie:	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
KvK-nummer:	908104
Straat en huisnummer:	Akkermaalsbos 12
Postbus:	59
Postcode en plaats:	6700AB WAGENINGEN
IBAN:	NL10RABO0397066465
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	Wageningen UR

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:	[redacted]
Functie:	Onderzoeker
Afdeling:	[redacted]
Telefoonnummer:	[redacted]
E-mailadres:	[redacted]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam:	[redacted]
Functie:	Onderzoeker
Afdeling:	[redacted]
Telefoonnummer:	[redacted]
E-mailadres:	[redacted]

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?	[x] Nieuwe aanvraag [ ] Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn [ ] Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum:	1 januari 2016
Geplande einddatum:	31 december 2016
Titel project:	Competitieve exclusieve flora in landbouwhuisdieren om antimicrobiële resistente bacteriën
Titel niet-technische samenvatting:	Een methode om antibioticum resistentie in landbouwhuisdieren te verminderen
Naam DEC:	DEC Wageningen UR
Postadres DEC:	Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen
E-mailadres DEC:	DEC@wur.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen:	€ 741,-
De leges voldoet u:	na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:	[x] Projectvoorstel [x] Beschrijving Dierproeven [x] Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Plaats:	Wageningen
Datum:	18 december 2015

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)
[redacted]
Postbus 59
6700 AB WAGENINGEN

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002015331

Bijlagen
2

Datum 22 december 2015
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 22 december 2015
Vervaldatum: 21 januari 2016
Factuurnummer: 15700331
Ordernummer: WUR 921842

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD401002015331	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

7

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek
[redacted]
Akkermaalsbos 12
Postbus 59
6700 AB Wageningen

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002015331

Uw referentie

Bijlagen

Datum 4 februari 2016
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [redacted]

Op 21 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Competitieve exclusie flora in landbouwhuisdieren om antimicrobiële resistente bacteriën te reduceren' met aanvraagnummer AVD401002015331. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben :

Welke informatie nog nodig
Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen;

Projectbeschrijving:
In het DEC advies wordt beschreven dat u de suggestie van de DEC overneemt en een optionele monstername op dag 42 toevoegt. Uit het herziene projectvoorstel en het aangevraagde aantal dieren menen wij te mogen opmaken dat u dag 42 heeft toegevoegd aan de experimentele opzet. Is dit een juiste aanname? Wanneer de monstername op dag 42 wat u betreft optioneel is kunt u dan aangeven op basis van welke criteria u besluit om dag 42 aan uw opzet toe te voegen?

3.4 Onderzoeksstrategie.
Hier beschrijft u als eerste stap selectie van pluimveebedrijf voor levering van microbiota-donoren.
Wij gaan ervan uit dat SPF -kippen alleen geleverd worden door een proefdierleverancier. Gezien het aantal dieren dat u aanvraagt voor deze stap , maximaal n=30, n= 5 voor screening, lijkt het dat u hier ervan uitgaat dat u niet meerdere leveranciers hoeft te screenen. Is het aantal van n=5 donorkippen representatief voor 1 bedrijf?
Kunt u aangeven hoeveel bedrijven u denkt te moeten screenen en wanneer het aantal opties is beperkt door het aantal leveranciers dat SPF –kippen levert zou u dan de tekst van de eerste stap kunnen herformuleren? Uit de bijlage dierproeven maken wij op dat de eerste stap in uw aanvraag is: Vast te stellen of de microflora van SPF-kippen geschikt is als donor-microflora, door de afwezigheid van antimicrobiële resistentiegenen.

Datum
4 februari 2016

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002015331

Bijlage dierproeven 3.4.4.1:

U beschrijft het mogelijk herhalen van het experiment, hiervoor vraagt u 2x 200 eendagskuikens aan, het aantal donordieren blijft gelijk. Is dit correct?

Bij Verfijning beschrijft u dat de dieren op strooisel worden gehouden en de beschikking hebben over een zitstok. Kunt u de mogelijkheden tot Verfijning in de huisvestingsomstandigheden meer in relatie brengen tot de leeftijd van de dieren die u inzet in uw onderzoek? Een zitstok lijkt voor deze leeftijdscategorie geen toevoeging in de zin van verfijning?
Wanneer u meer/ andere mogelijkheden tot Verfijning ziet kunt u dit dan aanpassen in de bijlage en de NTS?

Opsturen binnen voor 11 februari 2016
Stuur de ontbrekende informatie voor 11 februari 2016 op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

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.

Meer informatie
Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:
- formulier Melding Bijlagen via de post

Centrale Commissie Dierproeven

Melding

Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op www.centralecommissiedierproeven.nl
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw gegevens

1.1 Vul de gegevens in.

Naam aanvrager			
Postcode		Huisnummer	

1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.

Aanvraagnummer	

2 Bijlagen

2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.

- ☐
- ☐
- ☐

3 Ondertekening

3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Naam	
Datum	- - 20
Handtekening	

8

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek
[redacted]
Akkermaalsbos 12
Postbus 59
6700 AB Wageningen

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002015331

Uw referentie

Bijlagen

Datum 4 februari 2016
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Beste CCD,

Hartelijk dank voor het oordeel over onderstaande projectaanvraag. Ik heb de antwoorden op uw vragen in dit document ingevoegd. Referenties naar wijzigingen in de aanvraag heb ik in *cursief* aangegeven. Ik hoop u hiermee voldoende informatie te hebben gegeven,

Groeten, [redacted]

Op 21 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Competitieve exclusie flora in landbouwhuisdieren om antimicrobiële resistente bacteriën te reduceren' met aanvraagnummer AVD401002015331. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben :

Welke informatie nog nodig
Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen;

Projectbeschrijving:
In het DEC advies wordt beschreven dat u de suggestie van de DEC overneemt en een optionele monstername op dag 42 toevoegt. Uit het herziene projectvoorstel en het aangevraagde aantal dieren menen wij te mogen opmaken dat u dag 42 heeft toegevoegd aan de experimentele opzet. Is dit een juiste aanname? Wanneer de monstername op dag 42 wat u betreft optioneel is kunt u dan aangeven op basis van welke criteria u besluit om dag 42 aan uw opzet toe te voegen?

Wij hebben er inderdaad voor gekozen om de monstername op dag 42 toe te voegen aan de experimentele opzet. We hebben die keuze zo gemaakt omdat wij geen duidelijke criteria konden aangeven op basis waarvan we de mogelijkheid optioneel al dan niet zouden toevoegen. Daarnaast vonden we het argument van de DEC dat het effect het belangrijkst is op moment van slacht, heel helder. OP basis van die twee argumenten hebben we ervoor gekozen om in het herziene voorstel de monstername op dag 42 definitief toe te voegen.

3.4 Onderzoeksstrategie.

Hier beschrijft u als eerste stap selectie van pluimveebedrijf voor levering van microbiota-donoren.
Wij gaan ervan uit dat SPF -kippen alleen geleverd worden door een proefdierleverancier. Gezien het aantal dieren dat u aanvraagt voor deze stap , maximaal n=30, n= 5 voor screening, lijkt het dat u hier ervan uitgaat dat u niet meerdere leveranciers hoeft te screenen. Is het aantal van n=5 donorkippen representatief voor 1 bedrijf?

Kunt u aangeven hoeveel bedrijven u denkt te moeten screenen en wanneer het aantal opties is beperkt door het aantal leveranciers dat SPF –kippen levert zou u dan de tekst van de eerste stap kunnen herformuleren? Uit de bijlage dierproeven maken wij op dat de eerste stap in uw aanvraag is: Vast te stellen of de microflora van SPF-kippen geschikt is als donor-microflora, door de afwezigheid van antimicrobiële resistentiegenen.

Wij zijn hier wellicht niet duidelijk genoeg in geweest. Bij ons weten is er in Nederland maar 1 leverancier bekend van SPF kippenlijnen. We weten op voorhand niet of deze SPF kippen geschikt zijn om als donor te dienen, maar we hebben geen andere mogelijkheden voorhanden dan deze ene leverancier. Wij verwachten wel dat het screenen van 5 dieren van deze leverancier een duidelijk beeld oplevert van de aantallen antimicrobiële resistentiegenen. Hoewel de microbiota samenstelling behoorlijk kan variëren in 1 populatie, worden de antimicrobiële resistentiegenen zeer efficiënt verspreid binnen een populatie. Op basis daarvan verwachten we op basis van de aantallen antimicrobiële resistentiegenen in 5 dieren een goed beeld te hebben van de hoeveelheden binnen de SPF opfok van deze leverancier. Stap 1 van het proces is hiermee inderdaad: "Vast te stellen of de microflora van SPF-kippen geschikt is als donor-microflora, door de afwezigheid van antimicrobiële resistentiegenen." Zoals u hierboven stelt. Dit betreft een go – no go moment. Wanneer de donoren niet geschikt zijn, kan het experiment niet worden uitgevoerd. Dit is in het voorstel onder 3.4 Onderzoeksstrategie als volgt aangepast:

Ad 1. Screening van kippenbedrijf voor levering van microbiota-donoren
De eerste fase van het project bestaat uit screening van de microflora van SPF-donorkippen. Er is in Nederland 1 leverancier van SPF kippen. Deze kippen zullen worden gescreend op geschiktheid als microbiota donor. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van een bestaande microarray die alle bekende overdraagbare antimicrobiële resistentiegenen bevat. Hiermee kan gekeken worden naar de aantallen en de soorten antimicrobiële resistentiegenen die in de SPF kippen aanwezig zijn. Hiertoe worden kippen in de leeftijd van 3 – 6 weken, opgekocht en geëuthanaseerd waarna in de caeca wordt gekeken naar het aantal antimicrobiële resistentiegenen. Er wordt gekozen naar de caeca te kijken omdat daar de diversiteit van bacteriën het grootst is. De aantallen antimicrobiële resistentiegenen in SPF-kippen worden vergeleken met de aantallen antimicrobiële resistentiegenen van kippen uit de reguliere pluimveehouderij. De aantallen antimicrobiële resistentiegenen moeten significant lager zijn in de SPF donorkippen om de CEF strategie te kunnen laten werken. Als dit niet het geval is, betekent dit een NO GO voor het project.

Bijlage dierproeven 3.4.4.1:

U beschrijft het mogelijk herhalen van het experiment, hiervoor vraagt u 2x 200 eendagskuikens aan, het aantal donordieren blijft gelijk. Is dit correct?

Nee, dit is niet correct. Ik ben vergeten om ook het aantal donordieren te verdubbelen. Ik heb dit aangepast naar aanleiding van uw commentaar.

Bij Verfijning beschrijft u dat de dieren op strooisel worden gehouden en de beschikking hebben over een zitstok. Kunt u de mogelijkheden tot Verfijning in de huisvestingsomstandigheden meer in relatie brengen tot de leeftijd van de dieren die u inzet in uw onderzoek? Een zitstok lijkt voor deze leeftijdscategorie geen toevoeging in de zin van verfijning?

Wanneer u meer/ andere mogelijkheden tot Verfijning ziet kunt u dit dan aanpassen in de bijlage en de NTS?

In overleg met de dierverzorgers hebben wij besloten om de optie tot zitstok te handhaven in het voorstel onder het kopje verfijning. Het houden van de dieren op strooisel is een verfijning voor dieren van alle leeftijdscategorieën. U heeft gelijk dat de jongere dieren weinig tot geen baat zullen hebben bij een zitstok. Zij hebben echter ook geen last van een zitstok in de huisvesting. Aangezien wij de monstername op 42 dagen een vast onderdeel hebben gemaakt van de proefopzet, verwachten wij dat de dieren met name in de laatste twee weken van de proef wel profijt zullen hebben van de aanwezigheid van de zitstok. Dit is voor ons voldoende reden om de zitstok te handhaven. Wij konden geen andere mogelijkheden tot verfijning identificeren. Ik heb deze nuancering verwoord in het voorstel: *"Dieren worden gehuisvest in groepshuisvesting op vaste vloeren met strooisel en krijgen beschikking over een zitstok. Het strooisel vormt een verfijning voor alle leeftijden. De zitstok is alleen verfijning voor de oudere dieren in de groep, omdat op jonge leeftijd dieren nog geen gebruik maken van een zitstok."*

Opsturen binnen voor 11 februari 2016
Stuur de ontbrekende informatie voor 11 februari 2016 op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

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.

Meer informatie
Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:
- formulier Melding Bijlagen via de post

Centrale Commissie Dierproeven

Melding

Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op www.centralecommissiedierproeven.nl
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw gegevens

1.1 Vul de gegevens in.

Naam aanvrager			
Postcode		Huisnummer	

1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.

Aanvraagnummer	

2 Bijlagen

2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.

☐
☐
☐

3 Ondertekening

3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Naam	
Datum	- - 20
Handtekening	

Format

Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.zbo.ccd.nl

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	40100
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek

1.3 Vul de titel van het project in.	Competitieve exclusie flora in landbouwhuisdieren om antimicrobiële resistente bacteriën te reduceren.

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

In dit project wordt gekeken of de techniek van competitieve exclusie flora (CEF) geschikt is om de aantallen antimicrobiële resistentiegenen die voorkomen in de darm van kippen terug te dringen. De darm zit vol met bacteriën, waaronder ook veel bacteriën die antimicrobiële resistentiegenen bevatten. De kolonisatie van de darm met bacteriën, begint onmiddellijk na uitkomst van het kuiken uit het ei met de bacteriën die in de omgeving aanwezig zijn. Deze eerste kolonisatie is mede bepalend voor de microbioom samenstelling en diversiteit op latere leeftijd, inclusief het vóórkomen van antimicrobiële resistentiegenen. Het idee van CEF is de darm in dit bepalende stadium van de kolonisatie, op heel jonge leeftijd, te koloniseren met een stabiele, evenwichtige populatie van bacteriën die vrij zijn van antimicrobiële

resistentie genen. Deze donor-populatie zal afkomstig zijn van donor-kippen met Specific Pathogen Free (SPF) status. Dit koppel dieren wordt sinds de begin 90-er jaren in isolatie gefokt, en heeft nooit antibiotica toegediend gekregen. Hierdoor is de verwachting dat dit koppel kippen zeer lage aantallen resistentiegenen in de darm draagt. Door deze donor-populatie op heel jonge leeftijd toe te dienen, wordt het kuiken gekoloniseerd met een populatie bacteriën die vrij zijn van antimicrobiële resistentie genen. Deze 'schone' donor- populatie koloniseert de hele darm van de kuikens waardoor er geen ruimte meer beschikbaar is voor bacteriën die wel antimicrobiële resistentiegenen bevatten. De donor-populatie competeert met de bacteriën die antimicrobiële resistentiegenen bevatten. Dit is het principe van competitieve exclusie flora.

Het principe van competitieve exclusie flora (CEF) wordt in de pluimveehouderij al met succes toegepast. Het doel is hierbij niet de reductie van antimicrobiële resistentiegenen, maar het terugdringen van het aantal pathogenen in de darm om (latere) infecties te voorkomen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van het microbioom van gezonde volwassen kippen. Dit wordt op jonge leeftijd aan kuikens toegediend om bijvoorbeeld infecties met *Clostridium perfringens* (1) of Salmonella (2) te voorkomen. Daarnaast worden commerciële producten als Aviguard en Broilact breed ingezet bij eendagskuikens om ze te beschermen tegen pathogenen. Deze producten bevatten flora afkomstig van gezonde kippen, en worden als spray in kippenstallen toegediend, en leiden vervolgens tot een reductie van pathogenen. In de literatuur is veel aandacht besteed aan het anaerobe karakter van de donor-microflora. Voor veel bacteriën geldt dat blootstelling aan zuurstof toxisch is. Goren *et al.* (2, 3) hebben hier veel experimenten aan geweid en toediening via spray, drinkwater en direct orale toediening met een kropnaald met elkaar vergeleken. Toediening in drinkwater is geen geschikte methode, hierbij overleeft het merendeel van de microbiota niet. Hoewel directe orale toediening met een kropnaald beter lijkt te werken dan spray toediening, geven beide toedieningsmethoden een significante reductie van het aantal pathogenen in de darm (2, 3). Voorwaarde hierbij is dat de isolatie en opwerking van de donor-microflora gebeurt in een anaerobe kast.

Op basis van het succes van CEF op reductie van het aantal pathogenen in de kippendarm, wordt in dit project gekeken of met behulp van CEF een bijdrage kan worden geleverd aan de reductie van het aantal antimicrobiële resistentiegenen in de kippendarm.

De snelle toename van antimicrobiële resistentie van bacteriën die in mensen en/of dieren voorkomen, is een wereldwijd toenemend probleem. Methicilline resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) en de 'extended spectrum β-lactamase (ESBL) producerende bacteriën' zijn de meest bekende resistente bacteriën. MRSA komt vooral voor in omgevingen waar veel antibiotica worden gebruikt, zoals verpleeghuizen, ziekenhuizen en in de intensieve veehouderij. Overdracht van resistente bacteriën van dieren naar mensen vormt een ernstige bedreiging voor de volksgezondheid (ref. 4-7). De prevalentie van MRSA in varkens en vlees kalveren kan oplopen tot 75%. Alle vleeskuikenbedrijven zijn positief voor ESBL en 94% van de kipproducten in de winkel is besmet met ESBL producerende bacteriën. Het huidige beleid van het ministerie van Economische Zaken is gericht op een sterke reductie van het gebruik van antibiotica in de veehouderij. Dankzij dit streng antibioticum beleid raakt in Nederland ongeveer 1 procent van de ziekenhuispatiënten met de MRSA bacterie besmet, tegen 20 – 50% van de patiënten in buitenlandse ziekenhuizen. Het doel van dit project is het aantal anti-microbiële resistentie genen in de kippenhouderij verder te reduceren door toepassing van CEF.

Hiertoe wordt als eerste een donor-microflora bereid. Hiervoor worden SPF kippen gebruikt die nog nooit zijn behandeld met antibiotica. De microflora van deze kippen wordt gescreend op het aantal antimicrobiële resistentiegenen met behulp van een bestaande microarray. Deze microarray bevat alle tot nu toe beschreven resistentiegenen, en kan gebruikt worden om aantallen en soorten antimicrobiële resistentiegenen in een populatie te karakteriseren. Het aantal antimicrobiële resistentiegenen dat aanwezig is in deze SPF-kippen wordt vergeleken met het aantal antimicrobiële genen dat aanwezig is in praktijkkippen uit de pluimveehouderij. Er moet een groot, significant verschil in aantal antimicrobiële resistentiegenen zijn tussen deze beide kippen-populaties om CEF te kunnen uitvoeren. Als dit het geval is, wordt donor-micoflora bereidt uit de SPF kippen volgens de methode die Goren beschrijft. Hierbij wordt de microflora geoogst in een anaerobe kast en tot gebruik anaeroob opgeslagen. Voor de ontvangende dieren wordt een koppel kippen geselecteerd met relatief hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen. Eendagskuikens afkomstig van dit bedrijf zullen als ontvanger dienen voor de competitieve exclusie studie. Dit koppel wordt geselecteerd met behulp van de microarray.

1. Kaldhusdal M. et al. 2001. Reduced incidence of *Clostridium perfringens*-associated lesions and improved performance in broiler chickens treated with normal intestinal bacteria from adult fowl. Avian Dis. 45(1):149-56.

2. Goren E. et al. 1988. Reduction of salmonella infection of broilers by spray application of intestinal microflora: A longitudinal study by spray application of intestinal microflora. Vet. Q. 10:4, 249-255.

3. Goren E. et al. 1984. Protection of chicks against salmonella infection induced by spray application of intestinal microflora in the hatchery. Vet. Q. 6(2):73-79.

4. Leverstein-van Hall MA et al. 2011. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. Clin Microbiol Infec 17:873-880.

5. Overdevest I et al. 2011. Extended-Spectrum beta-Lactamase Genes of Escherichia coli in Chicken Meat and Humans, the Netherlands. Emerg Infect Dis 17:1216-1222.

6. van Loo I et al. 2007. Emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus of animal origin in humans. Emerg Infect Dis 13:1834-1839.

7. Voss A et al. 2005. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pig farming. Emerg Infect Dis 11:1965-1966.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Beschrijf de **algemene doelstelling** en haalbaarheid van het project.

Het doel van dit onderzoek is om proof of concept te leveren voor een nieuwe methode om de hoeveelheden antimicrobiële resistentiegenen in de darm van kippen te reduceren. Deze onderzoeksvraag komt voort uit de wettelijke taken die de Nederlandse overheid heeft belegd om in de veehouderij het aantal anti-microbiële resistentiegenen te reduceren om zo verspreiding van antimicrobiële resistente bacteriën naar de mens te verminderen. De nieuwe methode bestaat uit het toepassen van een specifieke vorm van het competitive exclusion flora (CEF) principe. In deze studie wordt gekeken of CEF werkt om het aantal antimicrobiële resistentiegenen in de kippendarm te reduceren.

Beschrijf de algemene doelstelling en **haalbaarheid** van het project.

De haalbaarheid van dit project wordt als hoog ingeschat. De methode van CEF wordt met succes toegepast voor de reductie van ziekteverwekkers. Technisch is het project dan ook goed haalbaar op basis van beschikbare methoden in de literatuur. De grootste uitdaging met betrekking tot de haalbaarheid zit in het verzamelen van geschikt donor materiaal. Wanneer blijkt dat ook de SPF kippen hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen bij zich dragen, is het niet mogelijk de studie uit te voeren.

3.3 Belang

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

Het belang van dit project is dat CEF een nieuwe methode zou kunnen zijn om het aantal antimicrobiële resistentiegenen in de pluimveehouderij te reduceren. Reductie van antibioticum resistentie is een belangrijk speerpunt van de overheid om te voorkomen dat antimicrobiële resistente organismen de mens kunnen infecteren. Hiermee is het maatschappelijke belang het voorkomen van humane infecties met antimicrobiële resistente bacteriën.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

De volgende stappen moeten genomen worden:

1. **Selectie van pluimveebedrijf voor levering van microbiota-donoren**
2. **Selectie van pluimveebedrijf voor levering van microbiota-ontvangers**
3. **Proof of concept studie in kuikens**

Ad 1. Screening van kippenbedrijf voor levering van microbiota-donoren

De eerste fase van het project bestaat uit screening van de microflora van SPF-donorkippen. Er is in Nederland 1 leverancier van SPF kippen. Deze kippen zullen worden gescreend op geschiktheid als microbiota donor. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van een bestaande microarray die alle bekende overdraagbare antimicrobiële resistentiegenen bevat. Hiermee kan gekeken worden naar de aantallen en de soorten antimicrobiële resistentiegenen die in de SPF kippen aanwezig zijn. Hiertoe worden kippen in de leeftijd van 3 – 6 weken, opgekocht en geëuthanaseerd waarna in de caeca wordt gekeken naar het aantal antimicrobiële resistentiegenen. Er wordt gekozen naar de caeca te kijken omdat daar de diversiteit van bacteriën het grootst is. De aantallen antimicrobiële resistentiegenen in SPF-kippen worden vergeleken met de aantallen antimicrobiële resistentiegenen van kippen uit de reguliere pluimveehouderij. De aantallen antimicrobiële resistentiegenen moeten significant lager zijn in de SPF donorkippen om de CEF strategie te kunnen laten werken. Als dit niet het geval is, betekent dit een NO GO voor het project.

Ad 2. Selectie van kippenbedrijf voor levering van microbiota-ontvangers

Een (regulier) vleeskuikenbedrijf met dieren met hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen wordt geselecteerd als ontvanger van de CEF therapie. Hiervoor wordt in eerste instantie gebruik gemaakt van de routinematige screening van kippen op slachtleeftijd. Bij deze screening wordt gekeken naar resistentie van de indicator organismen. Op basis van deze routinematige screening worden bedrijven geselecteerd met hoge aantallen resistentie indicator organismen. Vervolgens wordt met behulp van de microarray gekeken welke bedrijven de hoogste aantallen antimicrobiële resistentiegenen laten zien. Eendagskuikens afkomstig van het geselecteerde bedrijf worden ontvanger voor de proof of concept studie.

Ad 3. Proof of concept studie in kippen

Met de geselecteerde donorkippen en ontvanger kippen, wordt vervolgens een proof of concept studie uitgevoerd. Hiertoe worden 25 donorkippen van het geselecteerde bedrijf opgekocht. Deze worden geëuthanaseerd in een anaerobe kast. Dit is zeer belangrijk omdat een groot deel van de microbiota strikt anaeroob is. In deze anaerobe kast wordt darminhoud van de kippen verzameld. Vervolgens wordt dit materiaal toegediend aan de ontvangende eendagskuikens met behulp van een kropnaald. De controlegroep ontvangt fysiologisch zout zonder donor-microflora. Het doel van de studie is om te bepalen of door toediening van de schone CEF het aantal antimicrobiële resistentiegenen in de CEF groep lager is dan in de controlegroep. Om dit vast te stellen worden als functie van de tijd in beide groepen kippen geëuthanaseerd om te kijken naar de aantallen antimicrobiële resistentiegenen in verschillende darmdelen (jejunum & caecum).

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

Voor het bepalen van het aantal antimicrobiële resistentiegenen in de darm van SPF kippen wordt een aantal (max. 5) kippen geëuthanaseerd om de darm te kunnen bemonsteren. Als de screening aangeeft dat het aantal antimicrobiële resistentiegenen significant lager is in deze SPF kippen dan in de ontvangende kippen, worden vervolgens maximaal 25 kippen geëuthanaseerd om de donor-microflora te verzamelen.

Voor de proof of concept studie worden eendagskuikens afkomstig van een bedrijf met hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen in twee groepen verdeeld. De ene groep vormt de controlegroep, de andere groep wordt behandeld met een donor microbiota mengsel. Dit wordt oraal toegediend met behulp van een kropnaald. Vervolgens wordt de samenstelling van de microbiota in de darm van beide groepen vervolgd als functie van de tijd. Hiertoe worden op een aantal tijdstippen kuikens uit de proef genomen en geëuthanaseerd om monsters van de darminhoud te kunnen nemen. Alle kippen worden op een aantal tijdstippen bemonsterd door middel van een feces swab. Alle monstermaterialen worden gebruikt om de aantallen antimicrobiële resistentiegenen (resistoom) te bepalen/meten.

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

Het aantal antimicrobiële resistentiegenen dat aanwezig is in de darm van de SPF donor-kippen is cruciaal voor de uitvoering van het project. Wanneer deze aantallen niet significant lager zijn dan de aantallen antimicrobiële resistentiegenen van pratkijkdieren is dat een NO GO voor het project. Na de selectie van donor-kippen en ontvanger-kippen kan de proof of concept studie worden uitgevoerd.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.	
Volgnummer	Type dierproef
1	Effect van ‘competitive exclusion flora’ op aantallen antimicrobiële resistentie genen in de darm van kippen
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Bijlage
Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	40100
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 1 Type dierproef: Effect van 'competitive exclusion flora' op aantallen antimicrobiële resistentie genen in de darm van kippen

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

In de pluimveesector komen grote aantallen antimicrobiële resistentie genen voor. Het grootste aantal antimicrobiële resistentiegenen is aanwezig in de darm van dieren. De darm is hierdoor een aantrekkelijk doelwit voor methoden die de reductie van het aantal antimicrobiële resistentiegenen nastreven. Het doel van het hier beschreven experiment is proof of concept te leveren voor een nieuwe methode om het aantal antimicrobiële resistentie genen in de darm van pluimvee te verlagen. In dit onderzoek wordt geprobeerd de darm van kuikens op zeer jonge leeftijd te koloniseren met een SPF donor-microflora waar lage aantallen antimicrobiële resistentiegenen in aanwezig zijn. We verwachten dat hierdoor minder plaats vrij is in de darm voor micro-organismen mét antimicrobiële resistentiegenen. Dit principe wordt 'competitive exclusion flora' (CEF) genoemd. Dit principe wordt al toegepast in de pluimveehouderij om kolonisatie door ziekteverwekkers te voorkomen en/of te reduceren. Het is nog niet eerder onderzocht of het principe ook werkt om het aantal antimicrobiële resistentiegenen te verminderen. Dat is de vraagstelling van het hier beschreven experiment. Het experiment heeft ontvangende kuikens, die op zeer jonge leeftijd behandeld worden met SPF donor microflora waar lage aantallen antimicrobiële resistentiegenen in aanwezig zijn. De ontvangende conventionele

kuikens zijn afkomstig van een “gewone” commerciële broederij waar kippen hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen in de darm hebben, zodat het effect van de behandeling goed gemeten kan worden.

Om vast te stellen of de microflora van SPF-kippen geschikt is als donor-microflora, wordt de darm van de SPF kippen gescreend op het aantal antimicrobiële resistentiegenen. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van een bestaande microarray die alle bekende overdraagbare antimicrobiële resistentiegenen bevat. Hiermee kan gekeken worden naar de aantallen en de soorten antimicrobiële resistentiegenen die in de SPF kippen aanwezig zijn. Hiertoe worden kippen in de leeftijd van 3 – 6 weken, opgekocht en geëuthanaseerd waarna in de caeca wordt gekeken naar het aantal antimicrobiële resistentiegenen. Er wordt gekozen om naar de caeca te kijken omdat daar de diversiteit van bacteriën het grootst is. De aantallen antimicrobiële resistentiegenen in SPF-kippen worden vergeleken met de aantallen antimicrobiële resistentiegenen van kippen uit de reguliere pluimveehouderij. Om dit materiaal te verkrijgen, hoeven geen kippen te worden geëuthanaseerd. In de pluimveehouderij worden op reguliere basis caeca verzameld voor routinediagnostiek. Deze kunnen worden gebruikt voor de screening. De aantallen antimicrobiële resistentiegenen in SPF donorkippen moeten significant lager zijn dan in de praktijkdieren, om de CEF strategie te kunnen laten werken. Als dit niet het geval is, betekent dit een NO GO voor het project.

Als dit wel het geval is, worden 25 SPF-kippen gekocht voor het oogsten van de donor microflora. Deze kippen worden geëuthanaseerd en de darminhoud wordt verzameld. Dit gebeurt in een anaerobe kast, omdat veel van de bacteriën strikt anaeroob zijn en doodgaan zodra er zuurstof bij komt. De SPF donor microflora wordt ingevroren met glycerol om de bacteriën te “conserveren”.

Voor de proof of concept studie wordt voor een eenvoudige proefopzet gekozen. Er worden 200 eendagskuikens aangekocht op de geselecteerde broederij met hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen, die na aankomst in twee groepen worden verdeeld. De behandelgroep wordt direct na aankomst behandeld met de SPF donor microflora. Dit wordt oraal toegediend aan de individuele kuikens met behulp van een kropnaald. De controle groep krijgt op hetzelfde tijdstip een orale toediening van fysiologisch zout zonder microflora. De behandeling met SPF donor microflora wordt dagelijks herhaald gedurende 1 week. Vervolgens worden de kippen in de tijd vervolgd. Op 5 tijdstippen worden kuikens geëuthanaseerd om de aantallen antimicrobiële resistentiegenen in de darm te bepalen. De dieren worden gedurende het experiment onder standaard experimentele omstandigheden gehuisvest, waarbij de behandelgroep en controlegroep strikt van elkaar gescheiden worden.
Wanneer blijkt dat de kuikens onverwacht slecht reageren op de SPF donor microflora, wordt dit beschouwd als een no go voor het project. Een sterke verslechtering van de kuikens wordt als humaan eindpunt beschouwd en als no go moment voor de verdere voortgang van dit project.

De primaire uitleesparameter van deze proef is “Aantallen antimicrobiële resistentiegenen in de darminhoud in het jejunum en in het caecum”. Dit wordt bepaald door gebruik te maken van de speciaal hiervoor ontwikkelde microarray waarmee resistentiegenen gedetecteerd en gekwantificeerd kunnen worden.

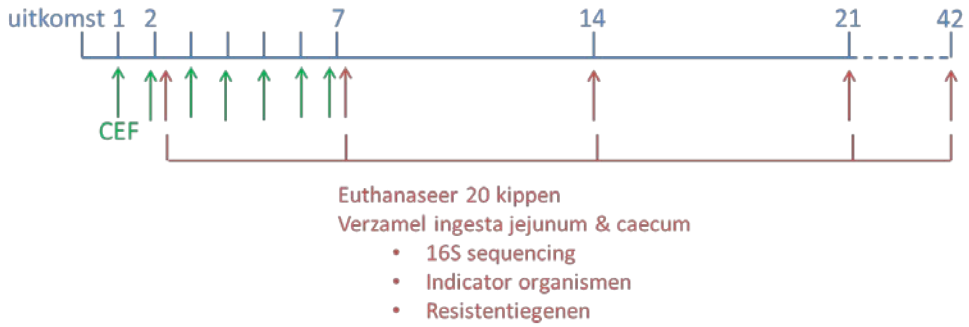
Daarnaast wordt ook gekeken naar de microbiële samenstelling van de microbiota in de darminhoud in het jejunum en in het caecum en naar de algemene gezondheid van de kippen. Dit zijn echter geen primaire uitleesparameters.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Voorafgaand aan het experiment, worden 5 SPF kippen geëuthanaseerd om het aantal antimicrobiële resistentiegenen in de darm vast te stellen.

Wanneer de aantallen antimicrobiële resistentiegenen significant lager zijn dan de aantallen antimicrobiële resistentiegenen in kippen van een regulier pluimveebedrijf, worden de kippen geschikt bevonden als SPF donor voor microflora. Om deze microflora te oogsten, worden 25 SPF kippen geëuthanaseerd en de darminhoud verzameld.

200 eendagskuikens van een geselecteerde broedrij met hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen worden aangekocht. Dit betreft conventionele Ross en/of Cobb kuikens die worden verdeeld in twee groepen van 100: een behandelgroep en een controlegroep. Beide groepen worden onder standaard experimentele omstandigheden gehuisvest in groepen. Eén dag na uitkomst worden beide groepen behandeld. De behandelgroep krijgt oraal SPF donor microflora toegediend met behulp van een kropnaald, terwijl de controlegroep op dezelfde wijze fysiologisch zout krijgt toegediend. Deze behandeling wordt dagelijks herhaald gedurende 1 week. Beide groepen worden vanaf dit moment strikt gescheiden om te voorkomen dat de orale SPF donor microflora via fecale besmetting ook in de controlegroep terecht komt. De kippen worden verder onder standaard omstandigheden gehouden. Als functie van de tijd worden kippen geëuthanaseerd om het aantal antimicrobiële resistentiegenen in de darm te bepalen. Op 2, 7, 14, 21 en 42 dagen na uitkomst, worden 20 kippen geëuthanaseerd waarna ingesta van jejunum en caecum wordt verzameld. Deze tijdstippen zijn bewust zo gekozen om de volgende redenen: Onmiddellijk na behandeling (t = 2 dagen) zou het effect van behandeling groot moeten zijn. Op 1 week leeftijd is de darm grotendeels gekoloniseerd. Hoewel de populatie nog niet stabiel is, is dit wel een goed moment om te controleren of er na vroege kolonisatie nog steeds verschil meetbaar is tussen de groepen. Op 14 dagen wordt de populatie stabieler, en gaat meer lijken op de volwassen populatie. Op 21 dagen is de populatie in de darm min of meer stabiel. Dit is dus een cruciaal moment om te kijken of er nog effect is van de behandeling. Tenslotte wordt ook gekeken op 42 dagen. Dit is de slachtleeftijd van kippen, waarna de kippen in de voedselketen terecht komen. Voor overdracht van resistente organismen naar de mens is dit een heel belangrijk moment, vandaar dat we ook op dat moment nogmaals monitoren of de behandeling effect heeft gehad op het reduceren van het aantal antimicrobiële resistente bacteriën.



Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

We zijn op zoek naar statistisch significante veranderingen in aantallen antimicrobiële resistentiegenen. Dit is een complexe uitleesparameter, die op voorhand niet gemakkelijk in getallen uit te drukken is. Voor een statistische berekening van het aantal benodigde dieren is een reële inschatting nodig van het verwachte effect. Die inschatting is erg lastig. Uit eerdere experimenten waarin is gekeken naar de samenstelling van microbiota in de darm, is gebleken dat er variatie is tussen individuen, waardoor grotere groepen noodzakelijk zijn om effect te kunnen meten. Uit een recent experiment in varkens is gebleken dat een groepsgrootte van 20 dieren voldoende is om deze variatie op te vangen en toch middelgrote effecten waar te nemen. Omdat we in dit experiment niet op zoek zijn naar een kleine verschuiving in samenstelling, maar in relatief grote veranderingen in het aantal resistentiegenen is ook in deze studie gekozen voor een groepsgrootte van 20 dieren per tijdstip.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Voor dit project zijn nodig:

- Maximaal 5 volwassen SPF kippen worden geëuthanaseerd om te bepalen hoeveel antimicrobiële resistentiegenen in de darm aanwezig zijn.
- Maximaal 25 volwassen SPF kippen worden geëuthanaseerd en gebruikt als SPF donor voor de microflora.
- 200 eendagskuikens afkomstig van een pluimveebedrijf met hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen worden gebruikt voor de proof of concept studie. Het is belangrijk dat deze dieren zo jong zijn omdat het ontwikkelen van een stabiele microbiota onmiddellijk na uitkomst begint. Hoe eerder de interventie wordt gepleegd, hoe groter het effect hiervan op de latere microflora zal zijn.

De eendagskuikens zijn afkomstig van een pluimveebedrijf met hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen. Dit is gebaseerd op de screening vooraf. Er wordt vervolgens vanuit gegaan dat deze screening representatief is voor de eendagskuikens afkomstig van dit bedrijf. Op basis van ervaring verkregen door de routinematige screening van bedrijven op het voorkomen van antimicrobiële resistente micro-organismen is dit terecht. Uit deze screening blijkt inderdaad dat bedrijven in de tijd vergelijkbare aantallen antimicrobiële resistentiegenen bij zich dragen. Omdat in de proef gebruik wordt gemaakt van eendagskuikens is het niet mogelijk om voorafgaand aan het experiment te controleren of deze kuikens inderdaad hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen bij zich dragen. Dat betekent dat het theoretisch mogelijk is dat, ondanks zorgvuldige selectie vooraf, de eendagskuikens minder antimicrobiële resistentiegenen bij zich dragen dan gewenst voor het experiment. Als dit in praktijk zo blijkt te zijn, kan geen proof of concept geleverd worden. Daarom houden we er in het project rekening mee dat de proef wellicht twee keer moet worden uitgevoerd.
Als blijkt dat de screening, geen eendagskuikens met hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen oplevert, moet de proefopzet worden aangepast. In dat geval kan mest van het aanleverende pluimveebedrijf worden ingebracht in de stal om de kuikens extra bloot te stellen aan de hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen. Dit is een extra parameter in de proefopzet, waar op voorhand niet voor gekozen wordt om niet onnodige variatie te introduceren. Wanneer dit echter nodig blijkt, zal voor deze extra parameter worden gekozen.

Dat betekent dat in totaal maximaal 55 volwassen SPF kippen (5 voor screening en 2 x 25 als donor) en maximaal 400 eendagskuikens (2 x 200) van een pluimveebedrijf gebruikt zullen worden.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☐ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging

Het onderzoek naar surveillance en terugdringen van resistente organismen binnen de veehouderij is een beleidsmatig voorgeschreven taak die wordt uitgevoerd door verschillende partijen. De dynamiek van aantallen antimicrobiële resistentiegenen die aanwezig zijn in de microflora, kan niet bestudeerd worden zonder daarvoor proefdieren te gebruiken omdat de ingewikkelde relatie tussen de gastheer en microflora *in vitro* niet is na te bootsen. Celkweken die bestaan uit meerdere celtypes zoals die vóórkomen in de darm zijn technisch niet haalbaar. Het grootste deel van de darmbacteriën is *in vitro* nog niet te kweken. De interactie tussen deze twee complexe systemen nabootsen *in vitro* is daarmee onmogelijk met de huidige stand van technische ontwikkelingen.

Vermindering

De groepsgroottes zijn zo beperkt mogelijk gehouden.

Verfijning

Dieren worden gehuisvest in groepshuisvesting op vaste vloeren met strooisel en krijgen beschikking over een zitstok. Het strooisel vormt een verfijning voor alle leeftijden. De zitstok is alleen verfijning voor de oudere dieren in de groep, omdat op jonge leeftijd dieren nog geen gebruik maken van een zitstok.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

De orale toediening met een kropnaald is eenvoudig en er is veel ervaring mee. Toch kan deze toediening zorgen voor pijn, stress en angst. De overige monsternames worden gedaan na euthanasie van de kippen. De euthanasie zelf zal kortdurend pijn, stress en angst opleveren. Op basis van literatuur en ervaring wordt niet verwacht dat de dieren ongerief ondervinden van de SPF donor microflora. Het valt echter ook niet volledig uit te sluiten. Daarom worden humane eindpunten gehanteerd wanner de kippen onverwacht een sterke achteruitgang hebben van hun algemene gezondheid.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Op basis van een literatuur studie en uitgebreide kennis van het veld van verschillende experts wordt gedacht dat deze studies niet eerder (elders) zijn uitgevoerd. Duplicatie is niet noodzakelijk.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☒ Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

☐ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☐ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De orale toediening met een kropnaald is eenvoudig en er is veel ervaring mee. Toch kan deze toediening zorgen voor pijn, stress en angst. De overige monsternames worden gedaan na euthanasie van de kippen. De euthanasie zelf zal kortdurend pijn, stress en angst opleveren. Op basis van literatuur en ervaring wordt niet verwacht dat de dieren ongerief ondervinden van de SPF donor microflora. Het valt echter ook niet volledig uit te sluiten. Daarom worden humane eindpunten gehanteerd wanneer de kippen onverwacht een sterke achteruitgang hebben van hun algemene gezondheid.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het beschreven ongerief wordt veroorzaakt door de toediening van de behandeling.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

De behandeling is eenmalig, voor monstername worden de dieren geëuthanaseerd.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Hoewel niet verwacht wordt dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is, valt niet volledig uit te sluiten dat de kippen een extreme reactie geven op de SPF donor microflora. Hierbij valt bijvoorbeeld te denken aan een heftige infectie in de darm die eventueel ook systemisch kan worden. Op basis van ervaring en literatuur wordt de kans hierop als beperkt ingeschat. Mochten de kippen een onverwachte sterke achteruitgang laten zien die duidt op een mogelijke infectie, dan wordt dit beschouwd als een humaan eindpunt. Daarnaast wordt dit

beschouwd als een No Go voor dit project.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

Dit risico betreft de helft van de eendagskuikens in de proef (n = 80), namelijk de kuikens die de SPF donor microflora ontvangen. De controlekuikens lopen dit risico niet.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van '*terminaal*', *'licht'*, *'matig'* of *'ernstig'* ongerief.

licht

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Tijdens de proef worden kippen als functie van de tijd bemonsterd. De primaire uitleesparameters van de proef bestaan uit analyses aan de ingesta van jejunum en caecum. Deze materialen zijn niet in voldoende hoeveelheid en op etische wijze te verkrijgen zonder de kippen te doden.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja

11

[redacted]

Van: DEC <dec@wur.nl>
Verzonden: dinsdag 16 februari 2016 14:41
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: RE: aanvullend advies gevraagd AVD401002015331

Categorieën: Dossier: [redacted]

Beste [redacted]

Wij hebben onderstaande suggestie gisteren in de DEC-vergadering besproken en de DEC komt tot de volgende conclusie:
In de proefopzet wordt al geselecteerd werd op bedrijven met een forse resistentie. De DEC verwacht dat dit voldoende moet zijn om te komen tot een goede uitvoering in de proef. In een pilot ziet de DEC geen toegevoegde waarde die het gebruik van extra dieren rechtvaardigt omdat dat (net als bij de selectieprocedure) gewerkt wordt met andere dieren dan de dieren waarmee de daadwerkelijke proef uitgevoerd zal worden. Ook met een pilot kan niet met zekerheid gezegd worden dat het hoofdexperiment slaagt.

De DEC hoopt hiermee de vraag van de CCD beantwoord te hebben.

Met vriendelijke groeten,

[redacted]

[redacted]
Animal Sciences Group, Wageningen UR
[redacted]
tel: [redacted]
fax: [redacted]
bezoekadres: [redacted]
e-mail: DEC@wur.nl

aanwezig: ma+di:8-16:30, wo+do: 8-12

Dit bericht is uitsluitend bestemd voor geadresseerde. Het bericht kan vertrouwelijke informatie bevatten. Gebruik door derden of openbaarmaking van dit bericht zonder toestemming van de Animal Sciences Group is niet toegestaan. Als u dit bericht per abuis heeft ontvangen, wordt u verzocht het te vernietigen en ons te informeren.

From: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Sent: vrijdag 12 februari 2016 13:23
To: DEC
Subject: RE: aanvullend advies gevraagd AVD401002015331

Fijn, bedankt [redacted] Dan kan het ook volgende week in de CCD vergadering verder besproken worden,

Fijn weekend, groeten [redacted]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl
.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

Van: DEC [mailto:dec@wur.nl]
Verzonden: vrijdag 12 februari 2016 10:42
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: RE: aanvullend advies gevraagd AVD401002015331

Beste [redacted]

Excuses, ik had begrepen dat deze vraag ook aan de onderzoeker gericht was. Rondsturen en een schriftelijke reactie van de DEC vragen heeft geen tijdswinst want a.s. maandag is de plenaire vergadering. Dan zal ik dit meenemen en kom dan maandagmiddag of dinsdagmorgen met een antwoord op je vraag.

Met vriendelijke groeten,

[redacted]

[redacted]
Animal Sciences Group, Wageningen UR
[redacted]
tel: [redacted]
fax: [redacted]
bezoekadres: [redacted]
e-mail: DEC@wur.nl

aanwezig: ma+di:8-16:30, wo+do: 8-12

Dit bericht is uitsluitend bestemd voor geadresseerde. Het bericht kan vertrouwelijke informatie bevatten. Gebruik door derden of openbaarmaking van dit bericht zonder toestemming van de Animal Sciences Group is niet toegestaan. Als u dit bericht per abuis heeft ontvangen, wordt u verzocht het te vernietigen en ons te informeren.

From: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Sent: vrijdag 12 februari 2016 8:51
To: DEC
Subject: RE: aanvullend advies gevraagd AVD401002015331

Geachte DEC,

Op onderstaande mail hebben wij nog geen antwoord van u ontvangen. Wij hadden u gevraagd om uiterlijk 11 februari uw advies te geven, kunt u aangeven wanneer wij uw aanvullend advies kunnen verwachten?

Vriendelijke groet, [redacted]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl
.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 4 februari 2016 10:38

Aan: 'DEC'
Onderwerp: aanvullend advies gevraagd AVD401002015331

Geachte leden van DEC WUR,

Bij de CCD is een aanvraag voor projectvergunning ingediend waarover uw DEC advies aan de CCD heeft uitgebracht. Het betreft de aanvraag AVD401002015331: Competitieve exclusie flora in landbouwhuisdieren om antimicrobiële resistente bacteriën te reduceren.

Wij willen u vragen om aanvullend advies over de volgende vraag:

In de beschrijving dierproeven bijlage 3.4.4.1, staat onder B. de dieren. De onderstaande tekst:

Omdat in de proef gebruik wordt gemaakt van eendagskuikens is het niet mogelijk om voorafgaand aan het experiment te controleren of deze kuikens inderdaad hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen bij zich dragen. Dat betekent dat het theoretisch mogelijk is dat, ondanks zorgvuldige selectie vooraf, de eendagskuikens minder antimicrobiële resistentiegenen bij zich dragen dan gewenst voor het experiment. Als dit in praktijk zo blijkt te zijn, kan geen proof of concept geleverd worden. Daarom houden we er in het project rekening mee dat de proef wellicht twee keer moet worden uitgevoerd.

Als blijkt dat de screening, geen eendagskuikens met hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen oplevert, moet de proefopzet worden aangepast. In dat geval kan mest van het aanleverende pluimveebedrijf worden ingebracht in de stal om de kuikens extra bloot te stellen aan de hoge aantallen antimicrobiële resistentiegenen. Dit is een extra parameter in de proefopzet, waar op voorhand niet voor gekozen wordt om niet onnodige variatie te introduceren. Wanneer dit echter nodig blijkt, zal voor deze extra parameter worden gekozen.

De nu gekozen opzet lijkt, ondanks de zorgvuldige screening van de bedrijven vooraf, als uitgangspunt een onzekere situatie te hebben. Het behalen van de doelstelling van dit project hangt af van de status van de proefdieren (in termen van aanwezigheid van antimicrobiële resistentiegenen) maar het is niet zeker wat deze status is in de proefdieren waarmee het project gestart wordt. Het zou een mogelijkheid zijn om vooraf van een pilotstudie uit te voeren met een aantal kuikens van het geselecteerde bedrijf, in de (huisvestings) omstandigheden van de experimentele setting om vast te stellen hoe de microflora zich ontwikkeld in de eendagskuikens wanneer zij buiten het geselecteerde bedrijf opgroeien. Wij horen graag de mening van de DEC over dit voorstel,

Daarnaast hebben wij nog een aantal inhoudelijke vragen ter verduidelijking aan de aanvrager voorgelegd. Deze vragen vind u in de bijgevoegde brief. Mocht u op deze vragen ook nog aanvullend willen adviseren dan horen wij dat graag.

In verband met behandeling in de volgende CCD vergadering willen wij u vragen om voor 11 februari 2016 te reageren,

Met vriendelijke groet, [redacted]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl
.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

13

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)
[redacted]
Postbus 59
6700 AB WAGENINGEN

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002015331

Uw referentie

Bijlagen
1

Datum 23 FEB. 2016
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [redacted]

Op 21 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Competitieve exclusieve flora in landbouwhuisdieren om antimicrobiële resistente bacteriën" met aanvraagnummer AVD401002015331. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 4 februari 2016 hebben wij u een aantal vragen gesteld. Deze heeft u op 8 februari 2016 beantwoord en het projectvoorstel en de bijlage dierproeven aangepast.

Beslissing
Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "Competitieve exclusieve flora in landbouwhuisdieren om antimicrobiële resistente bacteriën" starten. De vergunning wordt afgegeven van 24 februari 2016 tot en met 31 december 2016. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt.
Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure
Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. Dit advies is opgesteld op 27 januari 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Op 4 februari 2016 hebben wij de DEC om aanvullend advies gevraagd. De DEC heeft op 16 februari 2016 het advies aangevuld.
Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies en het aanvullende advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.
Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

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 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze gegevens in 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. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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

Meer informatie
Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

[redacted]

ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

Bijlagen
- Vergunning
  Hiervan deel uitmakend:
  - DEC-advies
  - Weergave wet- en regelgeving

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)
Adres:	Postbus 59
Postcode en woonplaats:	6700 AW WAGENINGEN
Deelnemersnummer:	40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 24 februari 2016 tot en met 31 december 2016, voor het project "Competitieve exclusieve flora in landbouwhuisdieren om antimicrobiële resistente bacteriën" met aanvraagnummer AVD401002015331, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:.

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 21 december 2015;
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
    a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 8 februari 2016;
    b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 27 januari 2016;
    c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 27 januari 2016, ontvangen op 27 januari 2016, aanvullend advies ontvangen op 16 februari 2016;
    d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 8 februari 2016.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Effect van 'competitive exclusion flora' op aantallen antimicrobiële resistentie genen in de darm van kippen	Kippen / eendagskuikens	400	Licht
Effect van 'competitive exclusion flora' op aantallen antimicrobiële resistentie genen in de darm van kippen	Donor kippen (SPF)	55	Licht

Aan deze vergunning zijn geen aanvullende voorwaarden gesteld.

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. Uit artikel 10b 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 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.
Artikel 10b schrijft 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 van Economische Zaken 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 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 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 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 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 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.

[redacted]

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 23 februari 2016 15:43
Aan: [redacted]
CC: [redacted]
Onderwerp: Beschikking AVD401002015331
Bijlagen: Dec advies 331.pdf; Beschikking AVD401002015331.pdf

Geachte heer, mevrouw,

Deze beschikking is ook per post verzonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl
.....
Bezuidenhoutseweg 73 | 2594 AC | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

	Inventaris Wob-verzoek W16-11S								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**document**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
	NTS2015336								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x					
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Advies CCD		x						x
8	Beschikking en vergunning				x		x	x	
9	Mail beschikking 18-1-2016				x		x	x	
10	Mail terugkoppeling DEC 28-1-2016				x		x	x	

Centrale Commissie Dierproeven

1

26 NOV. 2015

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.centralecommissiedierproeven.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.*	X Ja > *Vul uw deelnemernummer in*	11500
		☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]
		KvK-nummer	30244197
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	Instantie voor Dierenwelzijn
		Postbus	12007
		Postcode en plaats	3501AA Utrecht
		IBAN	NL27INGB0000425267
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[redacted] xDhr. ☐ Mw.
		Functie	[redacted]
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	[redacted]
1.5	*(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

1.6	*(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.	(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.7	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	☐ Ja > *Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag*	
		X Nee	

2 Over uw aanvraag

2.1	Wat voor aanvraag doet u?	X 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
		☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
2.2	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
2.3	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 einddatum van het project?	Startdatum	01 - 01 - 2016
		Einddatum	01 - 01 - 2017
3.2	Wat is de titel van het project?	Feasibility and short-term patency of a deep venous valve system for treatment of chronic venous incompetence	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Haalbaarheid en korte termijn werkzaamheid van een klepsysteem voor de behandeling van niet goed werkende aders	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC Utrecht
		Postadres	Universitair Medisch Centrum Utrecht | Kamernummer [redacted] Huispostnummer [redacted] Postbus 85500 | 3508 GA UTRECHT
		E-mailadres	dec-utrecht@umcutrecht.nl

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

X Nieuwe aanvraag Projectvergunning (enkel experiment) € 468 Lege

☐ Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
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.

☐ Via een eenmalige incasso

X Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

X Projectvoorstel

X Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

☐

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:

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- 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.
- 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	[redacted]
Functie	
Plaats	Utrecht
Datum	26/11/2015
Handtekening	[redacted]

[redacted]

2

Format
Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht
1.3	Vul de titel van het project in.	Feasibility and short-term patency of a deep venous valve system for treatment of chronic venous incompetence

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

- ☐ Fundamenteel onderzoek
- x Translationeel of toegepast onderzoek
- ☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- ☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- ☐ Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- ☐ Hoger onderwijs of opleiding
- ☐ Forensisch onderzoek
- ☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Chronic Venous Insufficiency (CVI) is a very common medical problem in the Western world. The incidence of CVI in the Western population up to 25% has been described and incidence increases with age. CVI is the result of failing venous valves deep venous system of the lower extremity, either primary or post-thrombotic. CVI is a significant cause of morbidity and complaints vary from mild ankle oedema to severe and therapy resistant venous ulcers ("open leg")[1,2].

To date, there are no curative therapies for CVI and compression therapy (either by compression bandage of stockings) remains the corner stone of treatment. The surgical treatment of deep venous valve insufficiency includes valve transplantation, or repair of existing valves. However theoretically very interesting, these autologous valve repairs are technically difficult and require relatively extensive dissection. Furthermore, these reconstructed valves tend to fail in 30% of cases or more[3-5].

Endovascular venous valve replacement with use of a prosthetic valve is considered an important promising idea, providing a less-invasive alternative to existing surgical techniques. Although the endovascular revolution led to many different prototypes and designs, to date no commercially available valve is regularly used[6].

It is assumed that the design of the valve determines the results after repair. The new valve (SailValve; fig 1) has been designed incorporating the following enhancements. To avoid migration, 2 stent rings without barbs create the essential stability to fix the device in the host vein. Since, the venous valve itself is not a complete circle, the new substitute was created to mimic the native valve anatomy. To discourage thrombosis, the design allows a little reflux, which hopefully will improve the patency of the valve. For this and to prevent the valve cusp from sticking to the wall, in the new design the cusp forms a ''sail'' going up and down in the bloodstream, generated by muscle contractions of the lower extremity (calfmuscle pump), without completely opening or closing.

Within the last years we showed that it was technically feasible to accurately implant a self-expanding valve into a porcine iliac vein. Within these first studies early thrombosis occurred. Further research led to optimization of anticoagulant therapy concomitant with venous stenting in pigs[6,7]. This was an important development enabling further development of venous valves. The length of follow up (in this study 2 and 4 weeks) can be subject to discussion. The rationale for choosing these follow up intervals was twofold: 1) it is assumed that if occlusion by thrombosis occurs, it will occur within the first days, and 2) the follow up intervals are in line international publications[6]. In this study, we plan to use a porcine model for the following reasons: 1) similarity of venous anatomy and vein diameters to human, 2) experience of the research team with endovascular procedures on pigs, 3) experience with anti-coagulation therapy as described above and 4) pigs are used in international studies previously[6]. A potential downside of the use of any 4-legged animal model is the absence of the hydrostatic pressure on veins in the hindlegs. We are convinced that this does not influence the results of the experiments, especially because no measurement regarding hemodynamics are performed. The fact that both goat and pigs are used repeatedly in international study underlines this point.

Thus after optimizing anticoagulant therapy and valve design, the proposed experiments are considered a critical last step in the newest prototype venous valve and proving it's feasibility is essential in the transition to certification / human implantation.

1 Prevalence of varicose veins and chronic venous insufficiency in men and women in the general population: Edinburgh Vein Study, Evans, Fowkes, Ruckley, Lee, J Epidemiol Community Health 1999; 53:149–153
2 Varicose veins and their management. Campbell, BMJ 2006;333:287-292.
3 Construction of peritoneal venous valves: an experimental study in rats and piglets. Van den Broek, Rauwerda, Kuijper, J Surg Res. 1991;50:279–283.
4 Repair and replacement of deep vein valves in the treatment of venous insufficiency. Wilson, Rutt, Browse, Br J Surg 1991;78:388–394.
5 An early experience with endovascular venous valve transplantation (letter). Dalsin, Sawchuk, Lalka, J Vasc Surg1996;24:903–904.
6 Percutaneous venous valve designs for treatment of deep venous insufficiency. De Borst, Moll, J Endovasc Ther. 2012;19:291–302
7 A percutaneous approach to deep venous valve insufficiency with a new self-expanding venous frame valve. De Borst, Teijink, Patterson, Moll. J Endovasc Ther. 2003;10:341–349.

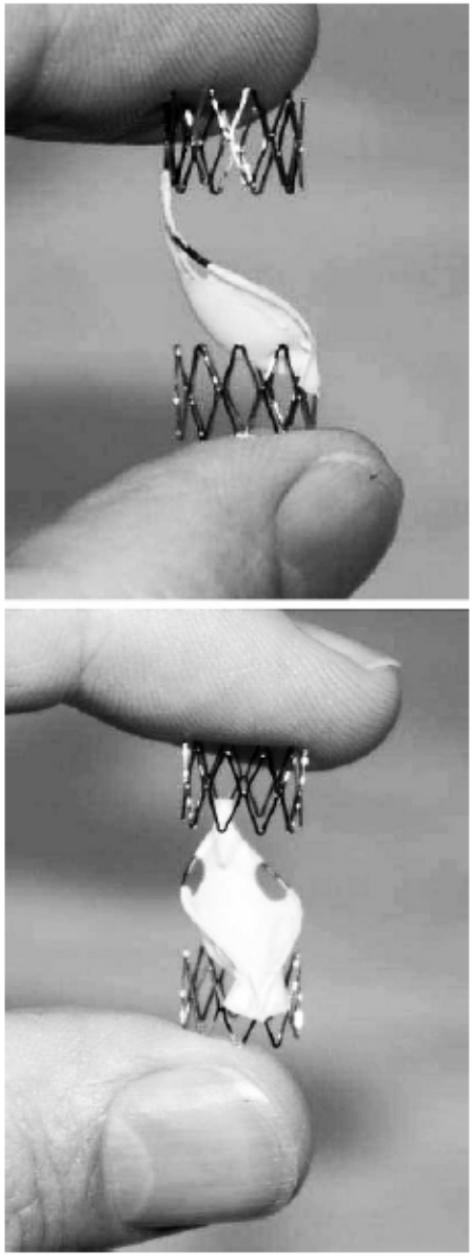


Figure 1: DVM SailValve

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

3.2

The study targets are twofold:

1) Prove safety and feasibility of accurate percutaneous placement of the newly design SailValve, via evolved catheter delivery system. Although previous studies showed favourable results regarding these parameters, it is of great importance to facilitate the certification and translation to human clinical research of this newly designed valve.
2) To evaluate the short term (2 and 4 weeks) patency of the Sailvalve venous valve system.

3.3 Belang

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

As decribed above, CVI is a common and important medical condition to which the optimal treatment paradigm and tools are still lacking. The development of a prosthetic valve replacement, which can be placed safely, might benefit many. These experiments are essential in the translation to humans & certification.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

This project is a **single experiment** to evaluated feasibility of the described endovenous valve placement.
One acute experiment in 1 pig is performed to assess any unexpected technical problems. The results of the pilot procedure is presented to the IvD and this is considered go/no-go moment. Afterwards the follow up experiments are initiated. To assess patency (secondary endpoint) 3 animals are euthanized at 2 weeks and the other 3 at 4 weeks follow up.

This experiment is not related to future experiments.

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

Study goal 1 : to ascertain if such a device, a percutaneously delivered venous valve system, can be implanted into the lumen of left and right swine iliac veins, via a catheter delivery system.

To evaluate the first study goal, we plan to implant the SailValve in the iliac veins of all animals.

To evaluate the patency of the valve explantation and histological examination is planned. Potential complications are evaluated by daily care. These parameter are secondary outcomes measures and results will published in descriptive way.

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

n/a

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.	
Volgnummer	Type dierproef
1	Acuut pilot experiment; 1 animal // Follow up experiment; 6 animals; 3 animals follow up 2weeks / 3 animals follow up 4weeks)
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage
Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 1 Type dierproef: Feasibility and short-term patency of a deep venous valve system for treatment of chronic venous incompetence

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

The SailValve venous valve is the final prototype after many years of design and benchmodeltesting. Animal experimental research remains necessary to evaluate safety and feasibility of implantation and the short-term patency / complications. We have chosen for a porcine model because in previous research we have shown that it is technically possible to implant a venous valve in the iliac vein of a porcine model and in previous experiments we optimized anticoagulant therapy concomitant to valve implantation[1].

The primary endpoint is feasibility (safe and accurate placement of the valve).
The secondary endpoints are 1) patency of the valve at 2 and 4 weeks follow up and 2) complications during follow up.

The period of 2 and 4 weeks follow up is in line with other (international) publications[2].

1 A percutaneous approach to deep venous valve insufficiency with a new self-expanding venous frame valve. De Borst, Teijink, Patterson, Moll. J Endovasc Ther. 2003;10:341–349.
2 Percutaneous venous valve designs for treatment of deep venous insufficiency. De Borst, Moll, J Endovasc Ther. 2012;19:291–302

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Seven animals will be studied (including 1 acute pilot experiment). Protocolized 14-day acclimatization in group housing at the GDL facility will be conducted.

All animals will be treated under general anaesthesia in supine position. The native valve system function will be assessed by ascending and descending phlebography and duplex ultrasonography. In line with previous experiments we expect iliac vein diameters between 6-10mm. The Sailvalves are manufactured with matching diameters (+25% oversizing). Via a small incision in the neck the jugular vein is exposed and punctured. The Sailvalve venous valve system (SVVS) will be implanted in both the left and right iliac vein. Placement will be guided and accurate positioning verified by fluoroscopy. Duplex ultrasound and phlebography will evaluate flow over the implant. Peroperative complications are scored. The oral anticoagulant therapy is started. 5-0 prolene sutures close the puncture site. The skin is closed with bio absorbing intracutaneous sutures.

After treatment all animals will recovery in separation. As soon as possible the animals will be returned to group housing. During follow up the animals are cared for by certified bio technicians and inspected daily for potential complications.

At 2 (3 animals) or 4 weeks (3 animals) a second procedure under general anaesthesia is scheduled: both ascending en descending phlebography and duplex are performed to evaluated patency. Surgical explantation of the iliac vein with Sailvalve is performed and samples will be stored with buffer solution and preserved in provided sample containers and transported to the pathology lab. Afterwards all animals are terminated.

SailValves will be individually packaged, containing a delivery device containing one valve and one delivery sheath/dilator set (sterile / disposable). Each device will be identified by a unique serial number. A list of the serial numbers of the test articles will be appended to, and become part of the Study Protocol. The serial number will be recorded on the operative report and necropsy reports associated with the animal.

All experiments will be performed under guidance of qualified Bio Surgical personnel following standard operating procedures available at the test facility.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

It is not possible to perform a formal power analysis for this experiment. The number of animals is chosen in line with internal expert opinion, previous experiments and international publications. Feasibility will be published in descriptive terms: the course of the procedure en potential problems will be described per animal. Analyzing feasibility using statistic tools is not the base of this study.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Study animals are female pigs of 70-90 kilograms of weight. The pig model was selected for this study due to their wide use in vascular (surgical) research because of their anatomical and physiological similarity to humans. In addition, pigs are readily available and their size permits various vascular surgical interventions. Previous experiments have shown that the external jugular veins in pigs (>50kg) are suitable for the introducer sheath and placement of the venous valve system in the iliac vein. Female animals are selected because of the tolerance to group housing in contrast to potential aggression in male animals.

To check for adequate function of essential study materials such as delivery device, one acute experiment will be performed consisting of valve placement in 1 pig. This animal will be terminated at the end of the test. Six animals will be used for the main study. Although unlikely; if animals die during surgery or in the first 24 hours after surgery will be considered surgical deaths and will not be entered into the study, unless cause of death is due to primary valve failure.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

X Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt

geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☐ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

This study aims to show safety and feasibility of placement of the Sailvalve system and the accompanying delivering catheter. Animal experiments in proven model are essential in this phase of development en testing. The venous valve system has been extensively tested in a bench model previously. To make sure that no animals are ordered or treated unnecessarily, 1 acute pilot experiment is planned. The goal of this pilot is to verify that the venous valve system can placed as planned using the delivering catheter.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

All animals will stay in group housing with standard "kooiverrijking" for 14 days prior to the experiment for acclimatization. After the experiments the animals are joined in grouphousing as soon as possible. Aggression is considered a contra-indication for group housing.
All experiments are performed under general anesthesia and with guidance of qualified biosurgical staff. The effect of the treatments on animal welfare is graded "licht". Severe complications are unlikely to occur. The acute pilot experiment is graded " terminal".

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

X Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

X Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

X Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☐ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

General peri-operative conditions, e.g. stress / recovery after anesthesia.
Potential postoperative complications, e.g. venous thrombosis, wound infection, pulmonary embolism.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

As described above

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Premedication and adequate pain control. Daily care by qualified biotechnical personel

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Severe complications are assumed unlikely to occur. Theoratically, pulmonary embolism or severe deep venous thrombosis could occur. These conditions are classified as humane endpoints.
Symptoms of deep venous thrombosis are: pain, redness, swelling, warm and sometimes shiny skin.
Symptoms of pulmonary embolism are: distress and (acute) respiratory impairment. These symptoms are likely to be co-existing with the symptoms of venous thrombosis. In some cases acute circulatory failure can be present.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

It is unlikely that these severe complications would occur. In none of the previous experiments serious complications were described.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van '*terminaal*', *'licht'*, *'matig'* of *'ernstig'* ongerief.

1 animal: terminal (pilot)
other animals: mild: induction and recovery of the initial procedure / mild discomfort and pain due to incision in the neck / induction for the second procedure

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee

X Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

At the end of the experiment the Sailvalve is explanted with surrounding iliac vein for histological evaluation. Bilateral iliac vein resection + ligation is only possible in a terminal experiment.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

X Ja

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2015.II.501.032
2. Titel van het project : Feasibility and short-term patency of a deep venous valve system for treatment of chronic venous incompetence
3. Titel van de NTS : Het testen in varkens van een klepsysteem voor aders

4. Type aanvraag:
   - ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
   - ☐ wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

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

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ☒ ontvangen door DEC: 11-09-2015
   - ☐ aanvraag compleet:
   - ☒ in vergadering besproken: 23-09-2015 en 21-10-2015
   - ☐ anderszins behandeld:
   - ☒ termijnonderbreking(en) van / tot : 30-09-2015 tot 19-10-2015
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
   - ☐ aanpassing aanvraag:
   - ☒ advies aan CCD: 17-11-2015

7. Eventueel horen van aanvrager
   - Datum:
   - Plaats:
   - Aantal aanwezige DEC-leden:
   - Aanwezige (namens) aanvrager:
   - Strekking van de vraag / vragen:
   - Strekking van het (de) antwoord(en):
   - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag:

8. Correspondentie met de aanvrager
   - Datum: 30-09-2015
   - Strekking van de vragen:

   Niet Technische Samenvatting

- 3.1 Beschrijving doelstellingen: U schrijft hier dat de klep via een prik onder lokale verdoving wordt geplaatst. De DEC ziet graag dat u dit anders formuleert.
- 3.3 Diersoort en geschatte aantallen: Hier spreekt u over 11 varkens (vrouw). Dit aantal klopt niet, bovendien raadt de DEC aan te spreken over 'vrouwelijke varkens'.
- 3.4 Verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdierendieren: Hier heeft u het over een flinke wond in de nek. De DEC raadt aan om 'flinke' weg te laten. Wellicht kan de grootte van de wond in cm worden weergegeven.

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: De verzoekt u hier aan te geven wat u al heeft gedaan in het voortraject en aan te geven hoe deze studie past in het traject van de translatie naar de kliniek.
- 3.1 Achtergrond: De DEC ziet beperkingen van het model aangezien het proefdier niet blootgesteld wordt aan hydrostatische belasting, die bij de mens wel bestaat. Daarnaast plaatst u een klep die eigenlijk jaren moet blijven zitten maar de follow up is slechts 4 weken. Graag nader toelichten/verhelderen.
- 3.1 Achtergrond: De DEC ontvangt graag meer informatie over de klep en de werking ervan.
- 3.2 Doel: Het doel is niet helder. Wat wil de onderzoeker precies weten t.o.v. van wat hij al weet, m.a.w. wat is precies het doel/de witte vlek?

Bijlage 1

- De DEC raadt u aan om nogmaals contact op te nemen met de IvD om e.e.a. beter af te stemmen en te formuleren.
- B. De dieren: U heeft het over 1+3+3=7 dieren maar ook over 10 dieren. Het gebruik van deze 3 extra dieren dient gemotiveerd te worden.
- J. Humane eindpunten: U geeft de criteria voor het humane eindpunt, maar de symptomen worden niet genoemd. Graag alsnog aangegeven.
- K. Classificatie van ongerief: U dient het ongerief ook te motiveren, zoals gevraagd op het formulier.

- Datum antwoord: 08-10-2015
- Strekking van de antwoorden:

Niet Technische Samenvatting

- 3.1 Beschrijving doelstellingen: Gewijzigd naar: Deze klep kunnen we via een kleine opening in een oppervlakkig bloedvat plaatsen in plaats van middels een klassieke grote operatie van n de lies en onderbuik.
- 3.3 Diersoort en geschatte aantallen: Het een en ander is aangepast naar 7 dieren. We zullen in deze aanvraag niet meer direct vragen om vervangende dieren. Alsmede wordt nu over vrouwelijke varkens gesproken.

- 3.4 Verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdierendieren: "flinke" is helaas per ongeluk terecht gekomen in de NTS. De verwachte incisie is beperkt en wordt nu conform jullie advies met lengte (5cm) beschreven.
- Bij 3.5 is het ongerief in overeenstemming gebracht met hetgeen vermeld wordt in Bijlage 1, nl 1 dier 'terminaal' en 6 dieren 'licht' ongerief.

  Projectvoorstel
- 3.1 Achtergrond: Het onderdeel 3.1 is uitgebreid om zo dit punt en derde punt te beantwoorden. Ook is een beschrijving van de klep (inclusief foto) toegevoegd.
- 3.1 Achtergrond: Het is inderdaad juist dat in varkens de hydrostatische druk anders zal zijn in vergelijking met de (rechtop lopende) mens. Het is echter niet ons doel om de dynamiek van het bloed door de klep te beschrijven. Derhalve delen wij deze zorg niet. Bovendien wordt in meerdere internationale publicaties eveneens gekozen voor varkens of geiten. Dit punt is verwerkt in de tekst. Onze rationale voor de relatief korte follow up periode is eveneens uitgewerkt in paragraaf 3.1.
- 3.1 Achtergrond: Zie punt 1
- 3.2 Doel: Doel is aangepast: The study targets are twofold: 1) Prove safety and feasibility of accurate percutaneous placement of the newly designed SailValve, via an evolved catheter delivery system. Although previous studies showed favourable results regarding these parameters, it is of great importance to acquire/facilitate the certification and translation to human clinical research of this newly designed valve. 2) To evaluate the short term (2 and 4 weeks) patency of the Sailvalve venous valve system.

  Bijlage 1
- Alle gereviseerde documenten zijn opnieuw door IvD beoordeeld.
- B. De dieren: In overleg met de IvD hebben we besloten niet direct in deze aanvraag om aanvullende dieren te verzoeken. Het doel van de extra dieren was om evt een onverwacht en niet aan klep-gerelateerd overlijden gedurende of direct na de ingreep te vervangen. De kans op dergelijke uitval is echter nihil.
- J. Humane eindpunten: Symptomen zijn alsnog uitgewerkt
- K. Classificatie van ongerief: In overleg met de IvD hebben we het een en ander gewijzigd tot het volgende: 1 animal: terminal (pilot) other animals: "mild": induction and recovery of the initial procedure / mild discomfort and pain due to incision in the neck / induction for the second procedure.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
   - Aard expertise:
   - Deskundigheid expert:
   - Datum verzoek:

- Strekking van het verzoek:
- Datum expert advies:
- Expert advies:

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

☒ uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
☐ uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
☐ uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
☐ wettelijk vereist.

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, dat door de DEC wordt ingeschat als substantieel. De aanvrager wil met voorliggende projectaanvraag bijdragen aan de ontwikkeling van een nieuwe syntetische klep voor therapeutische toepassing in humane patiënten met chronische veneuze insufficiëntie (CVI). CVI is een veelvoorkomende aandoening die grote invloed kan hebben op het dagelijks leven van patiënten. CVI is het gevolg van niet goed functionerende veneuze kleppen en is niet eenvoudig te behandelen. Voor vervanging of reparatie van aangedane kleppen met behulp van lichaamseigen weefsel zijn invasieve en technisch lastige ingrepen noodzakelijk. Patiënten zouden erbij gebaat zijn als een aangedane klep vervangen kan worden door een synthetische klep, onder andere omdat deze middels een minder invasieve ingreep geplaatst kan worden. De aanvrager heeft een dergelijke klep vervaardigd en met behulp van een *in vitro* proefopstelling geoptimaliseerd, en wil nu in varkens aantonen dat de klep *in vivo* zonder korte termijn complicaties op de gewenste plek geplaatst kan worden en functioneel is.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Om na te kunnen gaan of de ingreep technisch uitvoerbaar is wordt de klep onder terminale anesthesie in een varken geplaatst. Wanneer dit pilotexperiment slaagt wordt de hoofstudie gestart, waarin 6 varkens tot 2 of 4 weken na de ingreep gevolgd worden om korte termijn complicaties en de functionaliteit van de klep te beoordelen. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.

5. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
   - ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
   - ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
   - ☐ Dieren in/uit het wild (10f)
   - ☐ Gefokt voor dierproeven (11)
   - ☐ Zwerfdieren (10h)
   - ☐ Hergebruik (1e lid 2)
   - ☐ Huisvesting en verzorging
   - ☐ Locatie: instelling vergunninghouder (10g)

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Voor het varken dat de chirurgische ingreep onder terminale anesthesie ondergaat wordt het ongerief geclassificeerd als 'terminaal'. De andere 6 varkens zullen ten gevolge van het ontwaken uit de narcose en de napijn van de chirurgische ingreep ongerief ervaren dat wordt ingeschat als 'licht'.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. In het voortraject is het ontwerp van de nieuwe klep met behulp van een *in vitro* proefopstelling uitgebreid getest en geoptimaliseerd. Om te klep uiteindelijk toe te kunnen passen in humane patiënten zijn echter nog een aantal stappen noodzakelijk, waarbij het gebruik van proefdieren met een intact en functioneel cardiovasculair stelsel onvermijdelijk is. De eerstvolgende stap in de ontwikkeling vormt de doelstelling van deze projectaanvraag: aantonen dat de klep *in vivo* zonder korte termijn complicaties op de gewenste plek geplaatst kan worden en functioneel is.

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. Onnodig proefdiergebruik wordt voorkomen door de hoofdstudie (6 varkens) pas te starten, wanneer het terminale experiment (1 varken) heeft uitgewezen dat het plaatsen van de klep technisch uitvoerbaar is.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Het varken is een geschikt modeldier, omdat 1) de anatomie en fysiologie van het cardiovasculaire stelsel grote overeenkomsten vertonen met de mens, 2) de onderzoeksgroep veel ervaring heeft met vaatchirurgie in varkens, 3) de onderzoeksgroep met behulp van eerder uitgevoerde experimenten de noodzakelijk gebleken antitrombotische therapie geoptimaliseerd heeft, en 4) het varken wereldwijd gebruikt wordt in vergelijkbare studies. Er worden geen mannelijke varkens gebruikt, omdat deze in verband met agressie niet in groepen gehuisvest kunnen

worden. Dieren worden na een chirurgische ingreep tijdelijk solitair gehuisvest en intensief gemonitord, en zodra hun gesteldheid het toelaat weer in de groep geplaatst.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op grond van de onder C, punt 3, genoemde overwegingen is de DEC unaniem van mening dat het belang van de doelstelling – aantonen dat de klep *in vivo* zonder korte termijn complicaties op de gewenste plek geplaatst kan worden en functioneel is – substantieel is. De DEC is van mening dat de juiste onderzoeksstrategie gekozen is, en dat de experimenten noodzakelijk zijn voor het bereiken van de doelstelling. Het is niet mogelijk om dit onderzoek uit te voeren in mensen, en er zijn evenmin volwaardige *in silico* of *in vitro* alternatieven beschikbar. Er is voldaan aan de vereisten van vermindering en verfijning. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van de doelstelling opweegt tegen het lichte ongerief dat de dieren in dit project zullen ondervinden, en dat het gebruik van de dieren ethisch aanvaardbaar is.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

[redacted]

6

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht
[redacted]
Postbus 12007
3501 AA UTRECHT

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900 28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD115002015336

Bijlagen
2

Datum 1 december 2015
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 26 november 2015.
Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002015336. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD Opneemt

Wacht met de uitvoering van uw project
Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur
Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te betalen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500

Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde:
[redacted]
KvK-nummer: 30244197
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT

IBAN: NL27INGB0000425267

Tenaamstelling van het
rekeningnummer:
Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker
Naam: [redacted]
Functie: [redacted]
Afdeling: [redacted]
E-mailadres:[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Postbus 80.011
3508 TA Utrecht

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900 28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD115002015336

Factuurdatum	1 december 2015
Vervaldatum	1 januari 2016
Factuurnummer	201570336 / CB.841910.3.01.011

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD115002015336	741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

8

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht
[redacted]
Postbus 12007
3501 AA UTRECHT

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.

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

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD115002015336

Uw referentie

Bijlagen
1

Datum 18 JAN. 2016
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [redacted]

Op 26 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Feasibility and short-term patency of a deep venous valve system for treatment of chronic venous incompetence" met aanvraagnummer AVD115002015336. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing
Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "Feasibility and short-term patency of a deep venous valve system for treatment of chronic venous incompetence" starten. De vergunning wordt afgegeven van 19 januari 2016 tot en met 1 januari 2017. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt.

Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 november 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.
Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

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 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze gegevens in 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. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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

Meer informatie
Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:
[redacted]
ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

Bijlagen
- Vergunning
  Hiervan deel uitmakend:
  - DEC-advies
  - Weergave wet- en regelgeving

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:	UMC Utrecht
Adres:	Postbus 12007
Postcode en woonplaats:	3501 AA Utrecht
Deelnemersnummer:	11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 19 januari 2016 tot en met 1 januari 2017, voor het project "Feasibility and short-term patency of a deep venous valve system for treatment of chronic venous incompetence" met aanvraagnummer AVD115002015336, volgens advies van Dierexperimenten commissie DEC-Utrecht.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [redacted]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 26 november 2015;
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
    a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 26 november 2015;
    b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 26 november 2015;
    c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 17 november 2015, ontvangen op 26 november 2015.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Feasibility and short-term patency of a deep venous valve system for treatment of chronic venous incompetence	Varkens (Sus scrofa domesticus) / varkens 70-90 kilo	7	Licht

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. Uit artikel 10b 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 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.
Artikel 10b schrijft 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 van Economische Zaken 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 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 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 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 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 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.

9

[redacted]

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 18 januari 2016 10:09
Aan: [redacted]
CC: [redacted]
Onderwerp: Beschikking AVD115002016336
Bijlagen: DEC Advies.pdf; Beschikking AVD115002016336.pdf

Geachte heer, mevrouw,

Deze beschikking is ook per post verzonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl
.....
Bezuidenhoutseweg 73 | 2594 AC | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

10

[redacted]

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 28 januari 2016 16:45
Aan: [redacted]
Onderwerp: terugkoppeling AVD115002015336

Geachte leden van DEC Utrecht,

Bij de CCD is een aanvraag tot projectvergunning aangeboden waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het betreft het project Feasibility and short-term patency of a deep venous valve system for treatment of chronic venous incompetence met aanvraagnummer AVD115002015336. Bij u bekend onder nummer 2015.II.501.032. Er is geen aanvullende correspondentie geweest met de aanvrager. De CCD heeft besloten de aanvraag te vergunnen en hierbij uw advies gevolgd.

Met vriendelijke groet, [redacted]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl
.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

	Inventaris Wob-verzoek W16-11S								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**document**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
	NTS2016405								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x		x	x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x		x	x	
8	Bijlage beschrijving dierproeven 5				x		x	x	
9	DEC-advies				x		x	x	
10	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
11	Advies CCD		x						x
12	Beschikking en vergunning				x		x	x	
13	Mail terugkoppeling DEC 25-2-2016				x		x	x	

1

Centrale Commissie Dierproeven

28 JAN. 2016

AVD 1050020164 05

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.centralecommissiedierproeven.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.

☒ Ja > *Vul uw deelnemernummer in* 10500
☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	Rijksuniversitiet Groningen
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]
KvK-nummer	1179037

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	A. Deusinglaan 1 [redacted]
Postbus	
Postcode en plaats	9713 AV GRONINGEN
IBAN	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[redacted] ☒ Dhr. ☐ Mw.
Functie	[redacted]
Afdeling	[redacted]
Telefoonnummer	[redacted]
E-mailadres	[redacted]

1.5 *(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[redacted] ☒ Dhr. ☐ Mw.
Functie	PhD student
Afdeling	[redacted]
Telefoonnummer	[redacted]
E-mailadres	[redacted]

1.6	*(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.	(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
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
		☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
		Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
2.2	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
2.3	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 einddatum van het project?	Startdatum	1 - 12 - 2015
		Einddatum	1 - 12 - 2020
3.2	Wat is de titel van het project?	Train the sedentary brain: Move smart to reduce the risk of dementia	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Train het inactieve brein: Slim bewegen om de kans op dementie te verminderen	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC-RUG
		Postadres	A. Deusinglaan 1, [redacted]
		E-mailadres	secrdec.umcg@umcg.nl

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1727 Lege

☐ Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
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.

☐ Via een eenmalige incasso

☒ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

☒

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:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- 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.
- 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	[redacted]
Functie	[redacted]
Plaats	GRONINGEN
Datum	27-01-2016
Handtekening	[redacted]

Format
Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10500
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Rijksuniversiteit Groningen
1.3	Vul de titel van het project in.	Train the sedentary brain: Move smart to reduce the risk of dementia

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Background

Alzheimer's disease (AD) is the main cause of dementia.[1] AD is characterized by a progressive decline in several cognitive domains including learning, memory and language. The cause of AD is still largely unknown, and AD is viewed as a multifactorial and complex disease with aging as the main risk factor.[2,3,4] The only universal genetic risk factor for AD is the Apo-lipoprotein e4 (APOEe4) allele. Carriers of this allele have a significantly higher risk of developing AD. In contrast, carriers of the APOEe3 allele do not have an increased risk of developing AD. As compared to the homozygote APOEe3 genotype, heterozygous and homozygous APOEe4 carriers have a three to thirteen fold increased risk of developing AD respectively.[5]

Next to this genetic risk factor, physical inactivity has been recognized as an environmental (life style) risk factor for AD.[6-8] Of note, APOEe4 carriers are found to be particularly at risk with regard to the consequences of inactivity: Sedentary behavior moderates Amyloid plaque formation, a pathological hallmark of AD, in APOEe4 carriers.[9]

Optimally stimulating physical activity in humans to battle the development of AD is being researched intensively today in a national consortium funded by ZonMW Deltaplan Dementie, of which this project is the preclinical part. Clinical research by our partners takes place in individuals prone to develop AD or diagnosed with early signs of AD. A recent study performed in Groningen suggests that strength exercise, in combination with endurance exercise, is more successful in slowing down cognitive decline in AD patients than endurance exercise alone.[10] Use of endurance exercise interventions is currently common practice. Therefore, additional research is warranted to optimize the exercise protocols. However, the development of optimal exercise interventions is time consuming and in need of being directed by underlying neurobiological and neurobehavioral processes. The relation between specific types of exercise or physical inactivity and brain processes can best be studied in mice, as proposed in this project.

In addition to physical activity, cognitive stimulation may also reduce the progression of AD.[6] In mice, cognitive stimulation can be mimicked by providing a challenging environment, called "enriched environment". [11-13] Therefore, next to physical activity, cognitive stimulation by way of an enriched environment will be used as an intervention therapy to battle the development of AD. As episodic memory is one of the first types of memory negatively affected by AD, we specifically focus on the use of episodic memory tasks next to gold standard tasks in mouse studies on cognition.[14]

Motivation

A clear view of which type of physical activity (type of exercise) can be beneficial to counter AD will help to develop intervention therapies that prevent or slow down the progression of AD. This is of particular importance for the group of people most likely to develop AD, the APOEe4 carriers. Similarly, it is important to know in more detail what the effects of inactivity are on brain health and functioning, knowing that inactivity is a crucial risk factor for developing AD. We have seen that next to physical activity and inactivity, cognitive stimulation is beneficial for proper brain functioning. Therefore, combining physical and cognitive stimulation could be most beneficial in slowing down the progression of AD. Our mouse studies will help to direct the ongoing and planned exercise and cognitive stimulation projects with (early) AD patients in our national consortium, and will gain insight in the underlying brain mechanisms related to the selected intervention therapies.

Translational value
To examine the relationship between physical activity (exercise), physical inactivity and cognitive stimulation on brain functioning in slowing down AD pathology, we will use aging mice as well as APOE and AD mouse models. With this approach, we have the three major risk factors of developing AD under study: age, physical/mental inactivity, and the APOEe4 allele. Mouse studies provide an opportunity to disentangle the different risk factors and their effect on cognition, AD pathogenesis and brain health in general. These studies should provide a clearer view on the impact of the various interventions at the level of the brain and cognitive performance. The results will be translated into suggestions for more optimal physical/mental intervention therapies for humans in risk of developing AD.

The proposed experiments are part of a national consortium consisting of four research groups from the University of Groningen, the University Medical Center Groningen, the VU University Amsterdam and the Radboud University Medical Center. This consortium is funded by the ZonMW in the Memorabel program, which is part of the Deltaplan Dementie. We focus on pre-clinical research, whereas the other groups try to answer similar research questions by performing exercise intervention studies in elderly, APOEe4 carriers and AD-patients. Our animal studies have been designed so that they can be compared to these human studies in terms of exercise interventions and outcome measures. Cognitive functions that are tested in our animals are matched to those tested in humans. Moreover, markers for which the other groups will test in blood of elderly and patients, will also be tested for in our animal studies. In this way, we can translate our results to the human situation in a rather direct manner and link mechanisms uncovered in our studies to the outcomes of the human studies.

References:

1. Jellinger, K., Danielczyk, W., Fischer, P. & Gabriel, E. Clinicopathological analysis of dementia disorders in the elderly. *J. Neurol. Sci.* **95,** 239–258 (1990).
2. Association, A. Alzheimer ' s disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* **11,** 332–384 (2015).
3. Bertram, L. & Tanzi, R. E. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat. Rev. Neurosci.* **9,** 768–778 (2008).
4. Corder, E. H. *et al.* Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261,** 921–923 (1993).
5. Raber, J., Huang, Y. & Ashford, J. W. ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol. Aging* **25,** 641–650 (2004).
6. Barnes, D. E. & Yaffe, K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol.* **10,** 819–828 (2011).
7. Biswas, A. *et al.* Sedentary Time and Its Association With Risk for Disease Incidence, Mortality, and Hospitalization in Adults. *Ann. Intern. Med.* **162,** 123 (2015).
8. Dogra, S. & Stathokostas, L. Sedentary Behavior and Physical Activity Are Independent Predictors of Successful Aging in Middle-Aged and Older Adults. *J. Aging Res.* **2012,** 1–8 (2012).
9. Bugg, J. M. Exercise Engagement as a Moderator of the Effects of Genotype on Amyloid Deposition. *Arch. Neurol.* **69,** 636 (2012).
10. Bossers, W. J. R. *et al.* A 9-Week Aerobic and Strength Training Program Improves Cognitive and Motor Function in Patients with Dementia: A Randomized, Controlled Trial. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* (2015). doi:10.1016/j.jagp.2014.12.191
11. Fabel, K. *et al.* Additive effects of physical exercise and environmental enrichment on adult hippocampal neurogenesis in mice. *Front. Neurosci.* **3,** 50 (2009).
12. Bonenfant, D., Nguyen, A. Le & Aumont, A. Untangling the Influences of Voluntary Running , Environmental Complexity , Social Housing and Stress on Adult Hippocampal Neurogenesis. **9,** (2014).
13. Lambert, T. J., Fernandez, S. M. & Frick, K. M. Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* **83,** 206–216 (2005).
14. Dubois, B. *et al.* Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol.* **9,** 1118–1127 (2010).

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Objectives

- The first objective is to examine the relationship between physical (in)activity and brain health and cognition in the context of aging and AD.
- The second objective is to identify which type of exercise intervention, including combined exercise and cognitive stimulation, is best suited to counteract age-related and AD-related cognitive decline.

Six research questions will be answered:

1. How do physical inactivity, strength exercise and endurance exercise affect brain health and cognitive functioning in aging mice?
2. How do physical activity and cognitive stimulation interact to affect brain health and cognitive functioning in aging mice?

3. How do physical inactivity, strength exercise and endurance exercise interact with the genetic risk factor APOEe4 to affect brain health and cognitive functioning in human APOEe4 mice?
4. How do physical activity and cognitive stimulation interact with the genetic risk factor APOEe4 to affect brain health and cognitive functioning in human APOEe4 mice?

5. How do physical inactivity, strength exercise and endurance exercise affect brain health and cognitive functioning in the context of AD pathology in (amyloid) AD mice?
6. How do physical activity and cognitive stimulation affect brain health and cognitive functioning in the context of AD pathology in (amyloid) AD mice?

Achievability

To reach these objectives we will investigate the effects of strength exercise, endurance exercise, inactivity, cognitive stimulation, and combinations of these interventions on brain health and cognition in healthy (aged) mice, mouse models of AD and the APOEe4 genotype. Moreover, we will investigate cellular and molecular mechanisms that can explain the link between the primary functional output parameters (between cognitive functioning and cardiovascular fitness or strength).

Local facilities enable us to breed the APOEe4 and AD-mouse models, so that we can time the arrival of cohorts of mice as needed. Furthermore, our research group is experienced in performing both (episodic) learning and memory studies and exercise interventions in rodents.[1-3] Therefore we do not expect any major technical difficulties. Moreover, we have recently developed novel strength exercise methods and a novel inactivity method in mice.[4] Further studies are needed to ensure our strength exercise methods and inactivity methods are suitable for aged and AD-model mice. (Appendix 1) Similarly, tests for episodic memory need to be optimized too. (Appendix 2)

References:

1. [redacted]
2. [redacted]
3. [redacted]

4. [redacted]

3.3 Belang

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

General scientific and clinically relevance
Voluntary running in rodents, a form of endurance exercise, has been investigated quite extensively in pre-clinical studies and with respect to its effects on the brain.[1] Strength exercise has received far less attention.[2-4] It is of scientific relevance to reveal the mechanisms that underlie the effects of strength exercise on the brain: This is needed in order to fully understand the relationship between physical activity, which is more than just endurance exercise, and brain health. Clinical intervention studies employ exercise interventions which contain strength exercise components in both elderly an AD patients.[5] Animal studies can be used to optimize these interventions (for specific patient groups) and to elucidate the mechanisms via which they affect the brain.

There is a lack of knowledge on the mechanisms that underlie detrimental effects of inactivity on cognition and the brain in elderly and especially in AD patients.[6] Again, to elucidate the mechanisms that underlie the effects of inactivity on the brain is of scientific relevance as we do not know how inactivity affects the brain. One open question here is whether inactivity affects the brain by inhibiting effects on the same mechanisms and pathways that (endurance) exercise stimulates. Increasing our understanding on the effects of inactivity can help to design interventions that counter or prevent detrimental effects of inactivity in a clinical setting such as elderly homes or the hospital.

As is mentioned in part 3.1, studies performed in healthy mice show that cognitive stimulation and physical activity induce differential (neurogenic) effects that are thought to be complementary. This hypothesis has not been tested directly, nor in the context of APOE4 and AD. To understand how these environmental factors interact is of importance because interactions are likely to occur in any environment which is more complex than a standard laboratory setting, such as the home environment or a nursery home.

Genotype x Environment interactions
A deeper understanding of how environmental factors influence cognition and brain health can help to improve construct validity of transgenic animal models of complex diseases like AD. Since AD arises through interactions of environmental and genetic risk factors, animal models of AD should include both genetic (APOEe4) and environmental risk factors (e.g. inactivity) too. Novel methods we develop to induce physical inactivity can help improve the validity of any transgenic rodent model of a complex disease for which physical inactivity is an environmental risk factor. [7] Therefore an inactivity method is of scientific relevance for more than only AD mouse models.

The effects of inactivity and strength exercise have not been investigated in transgenic human APOEe4 mice and AD mouse models. The effect of endurance exercise has been investigated in rodent models, but very scarcely in APOEe4 mice.[1,8] It is of scientific relevance to investigate which mechanisms underlie the interaction between the APOEe4 genotype and exercise and inactivity that have been observed in humans, this increases our understanding of the pathogenesis of sporadic AD.[9] Clinically, this knowledge can be used to pinpoint which patients are likely to benefit from exercise interventions (e.g. all elderly or only APOEe4 carriers).

Episodic memory

We will investigate the effects of exercise or inactivity on a specific form of memory: Episodic memory. In AD patients episodic memory is affected in early stages of the disease.[10] How this form of memory is specifically affected by (in)activity and the APOE4 genotype in sporadic AD patients is not known. Research shows that the APOE genotype and neurotrophic factors that are affected by endurance exercise interact to influence episodic memory.[11] Knowledge of how episodic memory is affected by physical (in)activity could prove valuable in devising early intervention strategies for AD patients and people at risk of developing AD (marked by a decline in episodic learning and memory). Testing of this specific form of memory is not often performed in AD mouse models and has not been performed in APOE4 mice, testing episodic memory in APOEe4 and AD mouse models could help to elucidate possible causes of the early decline in episodic learning and memory in sporadic AD.

References:
[1] Intlekofer, K. A. & Cotman, C. W. Exercise counteracts declining hippocampal function in aging and Alzheimer ' s disease. *Neurobiol. Dis.* **57,** 47–55 (2013).
[2] Seo, D., Lee, S., Kim, N. & Ko, K. Humanized animal exercise model for clinical implication. *Pflügers Arch. …* **466,** 1673–1687 (2014).
[3] Konhilas, J. P. *et al.* Loaded wheel running and muscle adaptation in the mouse. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **289,** H455–65 (2005).
[4] Suijo, K. *et al.* Resistance exercise enhances cognitive function in mouse. *Int. J. Sports Med.* **34,** 368–75 (2013).
[5] Bossers, W. J. R. *et al.* A 9-Week Aerobic and Strength Training Program Improves Cognitive and Motor Function in Patients with Dementia: A Randomized, Controlled Trial. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* (2015). doi:10.1016/j.jagp.2014.12.191
[6] Brown, B. M., Peiffer, J. J. & Martins, R. N. Multiple effects of physical activity on molecular and cognitive signs of brain aging: can exercise slow neurodegeneration and delay Alzheimer's disease? *Mol. Psychiatry* **18,** 864–874 (2013).
[7] Hunter, D. J. Gene-environment interactions in human diseases. *Nat. Rev. Genet.* **6,** 287–298 (2005).
[8] Nichol, K., Deeny, S. P., Seif, J., Camaclang, K. & Cotman, C. W. Exercise improves cognition and hippocampal plasticity in APOE 3 4 mice. *Alzheimer's Dement.* **5,** 287–294 (2009).
[9] Head, D. *et al.* Exercise Engagement as a Moderator of the Effects of APOE Genotype on Amyloid Deposition. *Arch. Neurol.* **69,** 636–43 (2012).
[10] Dubois, B. *et al.* Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol.* **9,** 1118–1127 (2010).
[11] Ward, D. D. *et al.* APOE and BDNF Val66Met polymorphisms combine to influence episodic memory function in older adults. *Behav. Brain Res.* **271,** 309–315 (2014).

3.4 Onderzoeksstrategie

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

In order to perform the experiments designed to meet the objectives specified in part 3.2 we first need to meet the following prerequisites:
1. A working method to induce strength exercise in (aged) mice and AD model mice.
2. A working method to induce inactivity in (aged) mice and AD model mice.
3. A working cognitive test battery including episodic memory tests, which can be performed successfully by (aged) mice and AD mice.

Previous work
We are currently comparing a number of strength exercise and inactivity methods in order to select the most effective methods. These studies are performed in healthy adult mice. Two of the models used, burrowing and resistance running, have been shown to improve grip strength. Muscle tissue from these mice is being analysed to determine which of these models would be the best strength exercise method.[1] We were able to induce inactivity by using a lid in which the mice could not climb in and by using different cage sizes.[1] This inactivity method is being characterized further at the moment by determining its effects on grip strength, stamina and muscle tissue. A custom made episodic memory test, the automated Time-Place learning test, was

tested in adult mice in a single technical pilot study.[2]

Project strategy
We will start by further testing strength exercise and inactivity methods in healthy adult mice, aged mice and AD mice. This is necessary to ensure they can be used in aged and AD mice. (Appendix 1) We need to test and optimize our (custom made) automated Time-Place learning set-up and the What-Where-When-Which test (WWWW-test) for episodic memory in adult mice, aged mice and AD mice too (Appendix 2). Once these methods have been optimized, we can commence with the main experiments.

Main experiments. (Appendix 3, 4 and 5, can be performed in parallel)
Adult and aged mice, human-APOEe4 mice and human-APOEe3 control mice and AD mice will be submitted to intervention methods that induce inactivity, strength exercise, endurance exercise, cognitive stimulation (Enriched environment) and combinations of exercise and cognitive stimulation. The interventions will last for 10-12 weeks. After this period, the mice will be submitted to a set of cognitive tests (including episodic memory tests). Physical fitness tests will be used to measure physical fitness and motor functioning of the same animals to confirm that the (in)activity methods had the desired physical fitness effects.

Similar groups of mice will be undergoing the same interventions, but will not undergo cognitive testing. These mice will be sacrificed and their brain tissue, blood, cerebrospinal fluid and muscles will be analysed in the lab to determine how (in)activity interventions affect a number of neuro-molecular output parameters. Mice that did undergo cognitive testing cannot be analysed this way because of the confounding effects of the cognitive testing on a number of outcome parameters in the brain: Both exercise and learning and memory tests influence the same neuro-molecular mechanisms (i.e. neurogenesis and Brain-Derived Neurotrophic Factor signalling in the hippocampus), making it impossible to separate the effects of exercise and the memory tests.

References:
[1] [redacted]
[2] [redacted]
[3] Bour, A. *et al.* Middle-aged human apoE4 targeted-replacement mice show retention deficits on a wide range of spatial memory tasks. *Behav. Brain Res.* **193,** 174–82 (2008).

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

The project is divided in two smaller studies (Appendix 1 and 2) and three main studies (Appendix 3, 4 and 5). The smaller studies will be used to optimize our strength exercise models, inactivity models and episodic memory tests before commencing with the main experiments. The studies described in appendix 1 test strength exercise and inactivity methods. The studies described in appendix 2 test episodic memory tests.

The three main studies will all make use of the same animal procedures and general set-up, making use of (exercise) interventions, physical fitness tests and cognitive tests. Three different mouse models will be used in this same experimental set-up:
- Aged mice (and young mice as controls) (Appendix 3)
- Human APOE4 mice and human APOE3 mice (appropriate controls) (Appendix 4)
- Amyloid AD model mice (J20 mice) and wild-type controls (Appendix 5)

Animal procedures

The types of animal procedures that will be performed can be divided in three categories, which show the basic components and primary outcome measures of all experiments that are described.

1. Interventions to induce or reduce physical activity, or induce cognitive stimulation:
We are currently characterizing methods which allow us to induce strength exercise and inactivity on a voluntary basis. It could of course be that over the course of the project we have to conclude that these models do not suffice (e.g. aged mice do not engage in our voluntary forms of exercise). If this is the case, we will use forced methods. This is not expected though, since aged mice do still perform voluntary (resistance) running.[1]
- Voluntary models will be based on changing housing conditions. For example; for strength exercise this will be either the placement of a burrowing tube in the cage or access to a running wheel which is loaded to induce resistance while running.[1,2]
- Forced methods will be based on placing the mouse in an apparatus which forces it to be physically active or not. We will use an inclined treadmill to induce strength exercise in the form of resistance running.[3,4,5]

Endurance exercise and cognitive stimulation methods have already been developed and tested by other research groups. Voluntary running in a running wheel or forced running on treadmill will be used as a model for endurance exercise.[4,6] To induce cognitive stimulation we will house mice in enriched environments in which no running wheel will be present, placement of different objects and tubes and re-arrangement of these objects in a large cage will provide cognitive stimulation.[6]

2. Physical fitness tests
These tests will be used to measure the physical effects of the exercise intervention strategies and to confirm the exercise intervention had their predicted effects on musculature and the cardiovascular system.
- Using behavioural tests we will generate data on the functional effects of (in)activity on strength, endurance and coordination. These tests include the grip strength meter test to measure strength, a treadmill running tests to measure endurance and the balance beam test to measure coordination.

3. Cognitive tests:
Several tests will be used to measure the cognitive capabilities and cognitive decline in our mouse models. Many of these are based on voluntary behaviour of the mouse, but positive or negative reinforcers may be used.
- Cognitive tests include tests for episodic memory (The custom build automated Time-Place learning test and the What-Where-When-Which test (WWWW-test)[7], spatial learning (Morris Water Maze) and working memory (Y-maze test). To motivate the mice in the Time-Place learning task we will deprive the mice of food. This novel test is described in more detail in appendix 2.

References:
[1] Soffe, Z., Radley-Crabb, H. G., McMahon, C., Grounds, M. D. & Shavlakadze, T. Effects of loaded voluntary wheel exercise on performance and muscle hypertrophy in young and old male C57Bl/6J mice. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 1–17 (2015). doi:10.1111/sms.12416
[2] [redacted]
[3] Sakakima H. *et al.* The Effects of Aging and Treadmill Running on Soleus and Gastrocnemius Muscle Morphology in the Senescence-Accelerated Mouse (SAMP1). *The Journals of Gerontology* **59,** 1015-1021 (2004)
[4] Kemi, O. J., Loennechen, J. P., Wisløff, U. & Ellingsen, Ø. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol.* **93,** 1301–9 (2002)
[5] Aparicio, V. a *et al.* Effects of high-whey-protein intake and resistance training on renal, bone and metabolic parameters in rats. *Br. J. Nutr.* **105,** 836–845 (2011).
[6] van Praag, H., Kempermann, G. & Gage, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* **2,** 266–270 (1999).

[7] Davis, K. E., Easton, A., Eacott, M. J. & Gigg, J. Episodic-like memory for what-where-which occasion is selectively impaired in the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **33,** 681–98 (2013).

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

Phasing and Go/NoGo
As was mentioned in section 3.4.1 further testing of our novel strength exercise method, our novel inactivity method and the episodic memory tests is needed to ensure they can be used in the aged and AD-model mice. Only after we successfully tested a strength exercise and inactivity method, and successfully tested the episodic memory test, we can commence with the main experiments that use these methods.

Achievability Go/NoGo
One strength exercise method, resistance running, has been successfully tested in aged mice by another research group.[1] Moreover, with regard to our novel strength exercise method; Burrowing is performed up to at least 12 months of age (unpublished results). Therefore, we are confident that we can use these strength exercise methods in aged mice. Similarly, episodic memory has been tested in aged mice in our research group.[2] One of our episodic memory tasks will be based on object recognition and exploration by mice. A recent study performed in our group successfully used object recognition tasks in ten-month old mice. Other groups have used object recognition tasks to test hAPOE and AD mice of the age at which we will use these mice in our the experiments.[3-5] Therefore we are confident that we can successfully optimize and apply the proposed episodic memory tests (described in appendix 2).
Whether we can induce inactivity using our novel method is unsure: Theoretically mice housed under standard conditions may already be quite inactive, creating a ''floor effect'' which does not allow us to induce further inactivity. If this turns out to be the case, we will move on without the ''inactivity group'' in the experiments proposed in appendix 3,4 and 5.

Coherence
Our objectives will be achieved by testing the different (exercise) interventions and their effects on physical functioning and brain functioning in healthy aged, AD and human APOE4 mice using a similar set-up for all groups (see appendix 3, 4 and 5).

The physical fitness tests serve to confirm the expected effects of our (exercise) interventions on physical functioning of the mice. The cognitive tests serve will be used to investigate whether our interventions influence age-, APOEe4- or AD-related cognitive decline in our three mouse models (3.4.2.). The need to test both physical and cognitive parameters in every experiment emerges from a theoretical point of view: We hypothesize that physical/metabolic fitness and brain health/cognitive function are linked because signalling molecules and growth factors that regulate adaptations in musculature and cardiovascular systems influence brain health as well.[6]

Coherence – Main experiments
The use of the three different mouse models allows us to identify whether (in)activity and/or cognitive stimulation may differentially affects brain health and functioning in healthy elderly, elderly at risk for sporadic AD (APOE4 genotype) and AD patients. Testing these mouse models in the same set-up will help to compare them, and to specify at which phase in the development of AD these types of therapeutic interventions can be most useful. The use of an episodic memory test is expected to reveal cognitive decline in aged, APOEe4 and AD models. Episodic memory performance can serve as an early marker for AD in humans and therefore could be useful to place our different mouse models and the effects of (exercise) interventions at in different phases of AD pathogenesis.[7]

Together with the studies performed by our partners in the consortium, these animal studies should provide a clear starting point to devise

improved/optimized intervention strategies in relevant human groups: elderly at risk for AD, APOEe4 carriers and AD patients.

References:

[1] Soffe, Z., Radley-Crabb, H. G., McMahon, C., Grounds, M. D. & Shavlakadze, T. Effects of loaded voluntary wheel exercise on performance and muscle hypertrophy in young and old male C57Bl/6J mice. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 1–17 (2015). doi:10.1111/sms.12416

[2] [redacted]

[3] Bour, A. *et al.* Middle-aged human apoE4 targeted-replacement mice show retention deficits on a wide range of spatial memory tasks. *Behav. Brain Res.* **193,** 174–82 (2008).

[4] Nichol, K. E., Parachikova, A. I. & Cotman, C. W. Three weeks of running wheel exposure improves cognitive performance in the aged Tg2576 mouse. *Brain Res.* **184,** 124–32 (2007).

[5] Harris, J. A. *et al.* Many neuronal and behavioral impairments in transgenic mouse models of Alzheimer's disease are independent of caspase cleavage of the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* **30,** 372–381 (2010).

[6] Raichlen, D. a & Polk, J. D. Linking brains and brawn: exercise and the evolution of human neurobiology. *Proc. Biol. Sci.* **280,** 20122250 (2013).

[7] Dubois, B. *et al.* Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol.* **9,** 1118–1127 (2010).

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.	
Volgnummer	Type dierproef
1	Testing of strength exercise methods and physical inactivity methods in mice.
2	Testing of episodic memory tasks in mice
3	Effects of endurance exercise, strength exercise, physical inactivity and cognitive stimulation in adult and aged mice.
4	Effects of endurance exercise, strength exercise, physical inactivity and cognitive stimulation in hAPOE4 mice.
5	Effects of endurance exercise, strength exercise, physical inactivity and cognitive stimulation in Amyloid Alzheimer's Disease model mice.
6	
7	
8	
9	
10	

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, see 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'.	10500
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Rijksuniversiteit Groningen
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 1 Type of animal procedure: Testing of strength exercise methods and physical inactivity methods in mice.

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.

General strategy
The aim of the animal procedures described below is to test interventions that can be used as 1) a strength exercise method and 2) to induce inactivity in adult mice, aged mice and AD mice. The impact of these interventions will be measured by way of physical fitness tests. After characterizing these methods, we can select one strength exercise method and one inactivity method to use in the studies described in appendices 3-5.

Physical fitness tests will be used to measure functional effects of the physical (in)activity interventions by measuring muscle strength, stamina and motor coordination in a repeated measures design: These tests will be performed before, halfway through and after a 10-12 week intervention. A final physical fitness test, the treadmill endurance test, will only be performed after the intervention period. Additional data is gained by analysing muscle and heart tissue and can be used to confirm that the functional behavioural changes are accompanied by expected adaptations of muscle tissue and the cardiovascular system.

Testing sequence
1. Testing of strength exercise and inactivity methods in adult (male and female) mice.
2. Subsequently, we will test the same models in aged (male and female) C57Bl6 mice.
3. Finally, we will test both methods in (male and female) transgenic AD model mice (J20 mice, described in section B).

Only one suitable strength exercise (out of 3, see below) method and one inactivity (out of 3, see below) method will be tested at one time, going through the sequence of events described above step by step. If we successfully characterize one strength exercise method and one inactivity method, no further testing will be performed to characterize possible other methods.

Testing strength exercise and inactivity methods in both sexes in adult, aged and AD mice is needed to ensure our (in)activity interventions can be successfully applied in the main experiments described in appendices 3, 4 and 5.

Physical fitness tests: Primary outcome parameters and related animal procedures
- Strength will be measured using a grip strength meter. The mice are allowed to hold on to the meter, then the animal is pulled backwards by the tail until it releases the grid. Peak force is the primary outcome parameter to measure strength in the forelimbs or in all four limbs respectively.
- Stamina will be measured using the inverted screen test. Animals are placed on a grid, the grid is turned upside down and placed above a padded surface. The time until the animal has to let go of the grid and falls is taken as a measure for stamina.
- Endurance will be measured by running on a treadmill. At the end of lane on the treadmill there is a shock-grid which delivers a shock of ~0.3mA, which is used as a negative reinforcer to induce running on the treadmill. In a progressively harder endurance test the animals run until exhaustion. Maximum running speed (Vmax) is taken as the primary outcome measure.
- Coordination will be tested in the balance beam test. During this test, the animal is placed on a thin beam or rod, which it has to cross to reach its home-cage. The time needed to cross the beam and the number of errors (paw-slips) will be taken as primary outcome parameters for coordination.

We use these outcome parameters because they allow us to test whether the strength exercise and inactivity interventions have resulted in the expected functional changes.

Tissue analyses: Primary outcome parameters
- Muscles will be weighed to check for muscle hypertrophy (an effect of strength exercise) or muscle wasting (an effect of aging and inactivity).
- Hearth weight will be determined to check for cardiac hypertrophy (an effect of endurance exercise).
- Fat pads will be weighed to check for a decrease or increase in fat mass (an effect of endurance exercise or inactivity respectively).
- Additionally, muscle tissue will be collected and frozen so that it can be analysed using histological techniques. This can be used to check whether the cross sectional diameter of fast-twitch muscle fibres has increased (an effect of strength exercise) or decreased (a possible effect of inactivity).

These outcome parameters are matched to the results from the physical fitness tests.

Selection criteria for the proper strength exercise and inactivity interventions
A strength exercise method will be considered successful if it induces increases grip strength and does not increase endurance to the level of established endurance exercise methods (i.e voluntary running, this data can be found in literature and in our previous studies). Moreover, a good strength exercise method induces muscle hypertrophy or the diameter of fast-twitch fibres in skeletal muscles. An inactivity method will be considered successful if it reduces strength or endurance as compared to home-cage control mice.

[1] [redacted]

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

1. Strength exercise and inactivity interventions

Strength exercise methods
- Burrowing: For five days a week, a burrowing tube filled with sand and pebbles will be placed in the

cage of the mouse at the beginning of the dark phase so that it can empty it by burrowing overnight.
- Pseudo-burrowing: For five days a week, a burrowing tube filled with small wood chips (normal bedding for the mice) will be placed in the cage of the mouse at the beginning of the dark phase so that it can empty it by burrowing overnight. This is not a form of exercise for the mice, as the wood chips are very lightweight and easy to remove.
Pseudo-burrowers are a control group for the burrowing group. Burrowers need larger cages as compared to normally housed mice to make room for the burrowing tube and burrowing substrate that is removed. Moreover, balancing on the burrowing tube may affect physical fitness and coordination. To control for these factors, pseudo-burrowers will be used when the burrowing strength exercise method is selected.
- Resistance-running, low or high intensity, in a custom made set-up: Mice will be housed with a standard running wheel, a resistance on the rotation of the wheel is induced by hanging weights on a pulley attached to the axis of the running wheel.
- Tilted treadmill running: Mice will be placed in a treadmill for five days a week for 30-60 minutes. To mimic strength exercise, the treadmill will be tilted to an angle (~30 degrees) and intensity will be increased. Finally, an established rat weight pulling treadmill running paradigm will be adapted in terms of weight load to work for mice. [1,2]

Inactivity methods
- Inactivity induced by changes in cage size: Mice will be housed in a small cage (1/2 the size of a normal mouse cage).
- Inactivity induced by reduced climbing: Mice will be housed in a normal cage with a plastic lid, in which they cannot climb.
- Inactivity induced by changes in cage size and reduced climbing: Mice will be housed in a normal or small cage (1/2 the size of a normal mouse cage) with a plastic lid, in which the cannot climb.

2. Physical fitness tests
As mentioned in section A, physical fitness tests will be performed before, halfway through and after a 10-12 week (in)activity intervention.

- The grip strength test consists of two sessions: a total of four forelimb measurements and four forelimb and hind limb measurements. Each measurement takes approximately 10 seconds with breaks of 1 minute in between trials and a break of 2,5 minutes between sessions, adding up to a total duration of approximately 15 minutes.
- The inverted screen test starts with a 5 minute habituation period and consists of two trials with a 10 minute break in between trials. This break has proven sufficient to prevent any possible effects of fatigue in previously performed tests. Depending on how long the mouse can hold on to the screen, this test may take up to 50 minutes in total.
- Depending on the number of beams and rods that are included, the balance beam test can take 10-30 minutes. Addition of rods and beams that are of different width and shape can improve the ability of the test to discriminate between different exercise regimes. For every beam three trials will be performed, with 30 second breaks between them. Between to different beams, there will be a break of 1,5 minutes. This break has proven sufficient to prevent any possible effects of fatigue in previously performed tests.
- The treadmill endurance test consists of one trial. The duration of this trial is dependent on the endurance of the mouse and may take up to 45 minutes in total. The test is performed until exhaustion, which is classified as staying on the shock grid for 10 seconds despite prodding by the researcher. Early sign of fatigue are lowering of the tail and failing to run in the front part of the treadmill. Two days before the actual endurance test, a habituation trial of 12 minutes is performed to reduce novelty stress during the test.

[1] Kemi, O. J., Loennechen, J. P., Wisløff, U. & Ellingsen, Ø. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol.* **93,** 1301–9 (2002)
[2] Aparicio, V. a *et al.* Effects of high-whey-protein intake and resistance training on renal, bone and metabolic parameters in rats. *Br. J. Nutr.* **105,** 836–845 (2011).

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

A mixed repeated measures design is possible for the physical fitness tests, this design yields more power with a smaller number of animals as compared to a one-way ANOVA. A power analyses for a repeated measures ANOVA (between groups, based on a large effect size (f=0.4), an alpha of 0.05, beta of 0.8 and 0.5 correlation between measures) revealed a total of 45 mice is needed to test three groups (n=15 per group):

1. Home cage controls
2a. Strength Exercise
2b. Pseudo strength exercise (if burrowing is strength exercise method)
3. Inactive

We will need an additional group to control for certain elements of the strength exercise method depending on the strength exercise method that is suitable: the addition of pseudo-burrowers when the burrowing is our most promising method). We will adjust our power analyses based observations made (and data collected) in the studies that are being performed currently.[1]

We cannot re-use animals from these pilots since some of our primary outcome parameters depend on taking out and analysing muscles, fat tissue and the hearth.

[1] [redacted]
Unpublished results, [redacted]

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

1. Male and female C57Bl6J mice (mus musculus), bred by a certified European breeding company or bred in our own facilities, both adult (2-3 months old) and aged (14 months), will be used. (A maximum of adult: n=119, aged: n=133)
2. Male and female AD (J20) mice, on a C57Bl6J background, bred in our own facilities, adult (6 months) mice will be used. (n=140)

Testing in both sexes, aged mice and AD mice are needed to ensure our strength exercise and inactivty methods can be successfully applied in the main experiments described in appendices 3, 4 and 5. The AD model mice will be tested at the same age as they will be in the experiments described in appendix 5: 6 months old. At this age, these mice show a decline in several cognitive domains and formation of Amyloid plaques (a hallmark of AD). [1-3]

Estimated numbers
In every testing round, a total number of max. 17 adult, max. 19 aged and max. 20 AD model mice per group is needed to perform an experiment containing the following groups:
1. Home cage controls
2a. Strength Exercise
2b. Pseudo strength exercise (if burrowing is strength exercise method)
3. Inactive

We estimate to test a maximum of two strength and inactivity methods in adult mice, aged mice and in the AD mice. As soon as we successfully characterize one strength exercise method and one inactivity method, no further testing will be performed to characterize possible other methods.

Calculations
- Groups of 15 mice are needed to test under ideal conditions. If the selected strength exercise models are voluntary, an additional 2 mice may need to be added to ensure at least 15 animals perform the desired behaviour (observations made for resistance running and burrowing in our unpublished experiment being analysed currently).
- Due to mortality that comes with the aging process we are likely to lose up to 5% of the animals. An

additional 5% of the mice are expected to show signs of morbidity that come with age and which may confound results via systemic effects on the brain and behavior (e.g. development of stereotypic behavior, seizures, or tumor development).
- We expect to lose 15% of the AD mice (J20 strain) due to increased mortality which is part of the AD phenotype.[3,4]

Therefore we will include max. (15+2=) 17 animals per group when testing in adult mice and (15+2+5% + 5%=) 19 animals per group when testing in aged mice. When testing with AD mice, we will include (15+2+15%=) 20 animals per group.

In our most conservative scenario, in which two rounds of testing are necessary for adult, aged and AD mice, this adds up to:

- 2*(3 groups*17) = 102 adult mice
Or, when Pseudo-Burrowing is taken along for 1 round:
- 3 groups*17 + 4 groups*17 = 119 adult mice

- 2*(3 groups*19) = 114 aged mice
Or, when Pseudo-Burrowing is taken along for 1 round:
- 3 groups*19 + 4 groups*19 = 133 aged mice

- 2*(3 groups*20) = 120 AD mice
Or, when Pseudo-Burrowing is taken along for 1 round:
- 3 groups*20 + 4 groups*20 = 140 AD mice

References
[1] Mucke, L. et al. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci*. **20**, 4050–4058 (2000).
[2] Webster, S. J., Bachstetter, A. D., Nelson, P. T., Schmitt, F. A. & Van Eldik, L. J. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front. Genet*. **5**, 1–23 (2014).
[3] https://www.jax.org/strain/006293 (Website of Jackson, the supplier of this mouse strain)
[4] Cheng, I. H., Scearce-Levie, K., Legleiter, J., Palop, J. J., Gerstein, H., Bien-Ly, N., … Mucke, L. (2007). Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *J Biol Chem*, **282**(**33**), 23818–23828. http://doi.org/10.1074/jbc.M701078200

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

If the anticipated behaviour in the strength exercise and inactivity intervention is clearly not performed, we will cancel that round of pilots prematurely and re-use the animals in a next pilot round after a sufficient wash-out period of two weeks. This will reduce the number of animals needed to perform these studies.

The test that will produce the most adverse effects, treadmill running, will only be used at the end of a study and thus will not have been performed if a pilot is cancelled prematurely. The other physical fitness tests are classified as *mild* and can be used multiple times in the same animal. As a consequence we expect that the animals that would be re-used to do not experience an excessive amount of discomfort and results in the next round of pilots are not confounded.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

X No

☐ Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. 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: These experiments cannot be performed without the use of animals. The tests require the use of complex models as they have to mimic the interventions that could be performed in humans and there are no other models available that can be used to mimic the complex physiological adaptations in body (and brain) that are the consequence of physical (in)activity.

Reduction: Within each testing round, we cannot reduce the number of animals any further due potential loss of statistical power. By testing the most promising methods one-at-the-time in one-group-at-a-time (adult, aged, AD mice) we can stop and move on to another method as soon as we successfully characterized a model in the desired test group. This reduces the number of animals that are needed as compared to the situation in which all models are tested at once (or in all groups at once).

Refinement: Refinement: We aim to develop (exercise) interventions based on voluntary behaviour. This reduces stress due to handling as compared to forced methods. Habituation is used in behavioural tests where protocol allows for it. Furthermore, the shock intensity used in the treadmill test has been optimized in a previously performed pilot experiment and is set as low as possible (while still being a strong enough stimulus).

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

The behavioural tests will include habituation phases to reduce stress by handling or exposure to the test apparatus. Furthermore, the animals are habituated to handling and being moved from room to room during a habituation period at the start of each experiment.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

A literature search was used to identify existing exercise methods and their effects on the brain. We found that the effects of strength exercise or induced inactivity have scarcely been tested in rodents and that there are no truly well-characterized (voluntary) strength exercise methods available for mice at this moment.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

No

X Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

The animals will be housed individually during the 12 weeks of (exercise) intervention because it is necessary to monitor the physical activity of the individual. (e.g. amount burrowed, climbed or run)

G. Location where the animals procedures are performed

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

X No > Continue with question H.

☐ 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.

Classification of discomfort / humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

Animals may experience mild pain during the treadmill running test due to the mild electrical shock which is used as a negative reinforcer. This pain cannot be relieved, this would compromise the treadmill endurance test.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Animals may be mildly stressed by the treadmill exercise and by our novel method of induced inactivity. They may be moderately stressed by the treadmill endurance test.

Explain why these effects may emerge.

We expect no adverse effects on animal welfare during any of the voluntary exercise interventions, as these interventions are based on enriching the environment of the animal. With regard to the inactivity models, we may expect that housing in a smaller cage or a cage without climbing possibilities will adversely affect the welfare of the animal as it cannot engage in natural forms of locomotor activity. We expect treadmill running to induce mild/moderate stress and discomfort induced by the shock grid at the end of the treadmill lanes and moderate discomfort due to running until exhaustion.

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

The adverse welfare effects of the inactivity model cannot be avoided as this is an intrinsic part of the method. However, we will carefully monitor the inactivity groups to ensure they do not exert stereotypical behaviour that may compromise their well-being. It is of note that our pilot experiments did not reveal that this temporary increase in inactivity causes abnormal overt behaviour.

A habituation phase can assure the animals get used to running in the treadmill at a low pace, reducing stress and discomfort to some extent. We cannot replace the foot shock as it is essential to motivate the animals. (Animals will habituate to and eventually ignore touching and poking by the researcher)
Careful monitoring of the animals during the treadmill endurance test ensures they are placed back in their home cage as soon as they are exhausted.

J. 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 K.

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

An animal will be euthanized if a significant decline in general health status arises, indicated by for example a matt and lustreless fur, or by showing signs of pain. Mice will be euthanized if they lose more than 15% bodyweight, show piloerection or show abnormal behaviour, like strong decline in feeding/drinking, and reluctance to accept handling. We do not expect the animals to reach such a condition as a consequence of the experiments, but adverse health effects may arise sporadically during the aging process of the mice.

Indicate the likely incidence.

5% in aged animals. None of these cases are to be expected in the adult mice.

In the AD model mice (J20 mice) we might expect some morbidity related to the 15% increase in mortality, but the cause of premature death in this line is unknown (so we cannot be certain about increased morbidity).[1]

References:
[1] Cheng, I. H., Scearce-Levie, K., Legleiter, J., Palop, J. J., Gerstein, H., Bien-Ly, N., … Mucke, L. (2007). Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *J Biol Chem*, **282**(**33**), 23818–23828. http://doi.org/10.1074/jbc.M701078200

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

All of the behavioural tasks, the inactivity models and the possible forced treadmill running as a strength exercise model result in mild discomfort.

The treadmill endurance tests results in moderate discomfort due to the use of exhaustion as an endpoint is the test.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

To collect muscle tissue, fat pads and the hearth, which are needed to confirm the physiological effects of the (in)activity intervention.

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.

X Yes

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, see 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'.	10500
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Rijksuniversiteit Groningen
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 2 Type of animal procedure: Testing of episodic memory tasks in mice

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.

General strategy
The aim of the animal procedures described below is to test two episodic memory tasks that can be used to test different forms of episodic learning and memory in adult mice, aged mice and mouse models of AD:
- The What-where-when-which occasion test (WWWWtest) [1]
- The Automated Time-Place learning test [2]

The tasks cannot be tested in the same groups of mice, or two times in a row, as episodic learning induced by the tasks confounds the results obtained in subsequent episodic learning tests.[3] Therefore, separate groups of mice will be subjected to the two episodic learning tasks in two separate experiments.

Groups of adult, aged and AD mice will be undergoing the episodic memory tasks as described below. If mice learn to perform the tasks successfully we can use the tasks in the experiments described in appendices 3, 4 and 5. If the tasks are not performed successfully, some modifications to the protocol or materials may solve any problems. In the latter case, another round of testing is warranted to ensure the modifications work.

Testing sequence
1. Testing of episodic memory tasks in adult (male and female) C57Bl6 mice.
2. Subsequently, we will test the same tasks in aged (male and female) C57Bl6 mice.
3. Finally, we will test both tasks in (male and female) transgenic AD model mice (J20 mice, described in section B).

Testing in both sexes in adult, aged mice and AD mice, is needed to ensure these episodic memory tasks can be successfully applied in the main experiments described in appendices 3, 4 and 5.

What-Where-When-Which occasion test (WWWWtest) to test episodic cognitive functioning
This task has been described in literature[1] and is based on associative and sequential learning and recognition of novel objects and places. Because the test is quite complex, it is important to optimize the described protocols to make sure that the test can be performed successfully in our facility and by using our materials (i.e objects). The primary outcome parameters for this test are successful discrimination of novel objects, novel locations of familiar objects and association of a certain context and familiar or novel objects.

Test criteria:
If the healthy adult and aged mice tested can successfully discriminate between novel objects, novel locations of familiar objects and association of a certain context and familiar or novel objects the test is considered a success. If the AD mice show a decreased ability to discriminate, but a similar level of exploratory behaviour as compared to the healthy mice, we still consider the test a success: Episodic memory is likely to be affected in early stages of AD and in AD mouse models. We are interested in investigating the effects of our exercise interventions on this form of cognitive decline.

Automated Time-Place learning task to test circadian system dependent episodic cognitive functioning
The automated Time-Place learning test will be used to test time-place learning. This type of learning depends on a form of learning and memory which does not rely on a temporal order of events (as the WWWWtest does) but on the actual circadian time of day on which an event takes place.[4] This is a different form of episodic memory then that which is necessary in the object based tasks described above. We will use a modified home-cage in which the food deprived animal is able to move around freely. In the upper part of the cage three platforms are located, which may or may not give access to a food reward depending on the time of day. The mouse will fall to the bottom of the cage when attempting to cross them at the wrong time of day. The percentage of correct choices is the main output parameter.

Test criteria:
If the healthy adult and aged mice tested can successfully learn to find food at the right time at the right locations the test is considered a success, this is indicated by a percentage of correct choices above chance level. If the AD mice show a decreased ability to learn, but a similar or higher level of attempts to get to the food behaviour as compared to the healthy mice, we still consider the test a success (As was mentioned in the test criteria section of the WWWWtest above: Episodic memory is likely to be affected in early stages of AD and in AD mouse models, we are interested in investigating the effects of our exercise interventions on this form of cognitive decline.

References:
[1] Davis, K. E., Easton, A., Eacott, M. J. & Gigg, J. Episodic-like memory for what-where-which occasion is selectively impaired in the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **33,** 681–98 (2013).
[2] Unpublished results and personal communication with [redacted]
[3] [redacted]
[4] [redacted]

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

WWWWtest
During this test the animal is placed in a testing arena containing objects. We will use object based tasks based on the animals' natural tendency to explore novel objects and objects moved to novel locations

(spatial novelty) to measure simple associative forms of memory as well as more complex forms of spatial learning and episodic memory. If the animal remembers the identity of the object or the location of the individual objects it will preferentially explore any novel or moved objects during a test session which is performed after an initial conditioning test session. If the animal formed a poor memory during conditioning (i.e. does not remember which objects were shown in the conditioning session) it will explore all objects to a similar extend. Thus, exploration levels during the test session is primary readout for these tasks. We will extend the often used Novel-Object recognition task and Spatial Location Recognition task by including a more elaborate What-Where-Which occasion task and a What-Where-When task. These tests dependent on the association of an object, location, temporal order of events and contextual information and the integration of these elements to form an episodic memory of an event.

Duration and frequency:
The different object recognition tasks will be tested over the course of 25 days, including 5 days of habituation.[1] These days include several habituation days, acquisition days and testing days. On each day, the animal will spend a total 10 minutes in the testing arena.

Automated Time-Place learning task
The manual Time-Place learning paradigm has been developed by research of our group, and is a successful but labour-intensive and time-consuming procedure.[2] Moreover, the test uses mild electric shocks to stimulate learning. It is impossible to perform this test with large groups of mice due to practical constrains (the time needed to perform the test). However, an automated version of the test has been developed.

We aim to optimize this automated time-place learning protocol so that we can use it for the experiments described in appendices 3, 4 and 5. The animals will need to be food deprived to perform the automated time-place learning task as the time-place learning depends on a food reward which serves a positive reinforcer. We will use a modified home-cage in which the food deprived animal is able to move around freely. In the upper part of the cage three platforms are located, which may or may not give access to a food reward depending on the time of day. The mouse will fall softly to the bottom of the cage (containing soft bedding) when attempting to cross them at the wrong time of day.

Duration and frequency:
The manual version of the time place learning test takes up to 21 days. We may assume the automated version will take as long, but this will need to be tested.

References:
[1] Davis, K. E., Easton, A., Eacott, M. J. & Gigg, J. Episodic-like memory for what-where-which occasion is selectively impaired in the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **33,** 681–98 (2013).
[2] [redacted]

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

A repeated measures design is possible for the automated Time-Place learning test: To track progress over the course of 10-21 days a power analyses (within subjects, based on a large effect size (f=0.4), an alpha of 0.05, beta of 0.8 and 0.25 correlation between measures) revealed a total of 10 mice are needed to reveal a learning effect over time for this test.

A one-sample (one-tailed) t-test will be used to determine whether object discrimination differs from chance in the WWWWtest. A power analyses (within subjects, based on a medium-large effect size (d=0.65), an alpha of 0.05, beta of 0.8) revealed a total of 12 mice are needed to reveal a learning effect for this test.

These power analyses will be adjusted based on the results obtained in the first round of experiments.

In order to perform the episodic memory tasks, we need experimentally naïve animals. We cannot re-use animals in these pilots if an episodic memory tasks is performed, since episodic learning affects

subsequent episodic learning.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

1. Male and female C57Bl6J mice (mus musculus), bred by a certified European breeding company (adult) or bred in our own facilities (aged), both adult (2-3 months old) and aged (14 months), will be used. (adult: n=44, aged: n=50)
2. Male and female Amyloid AD (J20) mice, on a C57Bl6J background, bred in our own facilities, adult (6 months) mice will be used. (n=52)

Testing in both sexes, aged mice and AD mice is needed to ensure our episodic learning tasks can be successfully applied in the main experiments described in appendices 3, 4 and 5. The Amyloid AD model mice will be tested at the same age as they will be in the experiments described in appendix 5: 6 months old. At this age, these mice show a decline in several cognitive domains and formation of Amyloid plaques (a hallmark of AD). [1-3]

A total number of max. 10 adult, 11 aged or 12 AD model mice are needed to test the automated Time-Place learning test once. A total number of 12 adult, 14 aged or 14 AD model mice animals are needed to test the WWWWtest once.

We expect to need at two test rounds for both the WWWWtest the automated Time-Place learning task in adult mice and aged and Amyloid AD mice. But we will stop testing in any of the adult, aged or AD groups as soon as a test is deemed successful.

Calculations
- Groups of 10 and 12 mice are needed to test the automated Time-Place learning task and the WWWW task respectively.
- Due to mortality that comes with the aging process we are likely to lose up to 5% of the animals. An additional 5% of the mice are expected to show signs of morbidity that come with age and which may confound results via systemic effects on the brain and behavior (e.g. development of stereotypic behavior, seizures, or tumor development).
- We expect to lose 15% of the AD mice (J20 strain) due to increased mortality which is part of the AD phenotype.[3,4]

Therefore we will include 10 or 12 animals per group when testing adult mice, (10+5%+5%=) 11 or (12+5%+5%=) 14 animals per group when testing aged mice and (10+15%=) 12 or (12+15%=) 14 animals when testing in AD mice.

In our most conservative scenario, in which two rounds of testing are necessary for adult, aged and AD mice, this adds up to:

- 2*(1 group*10) + 2*(1 group*12) = 44 adult mice
- 2*(1 group*11) + 2*(1 group*14) = 50 aged mice
- 2*(1 group*12) + 2*(1 group*14) = 52 AD mice

References

[1] Mucke, L. et al. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci*. **20**, 4050–4058 (2000).
[2] Webster, S. J., Bachstetter, A. D., Nelson, P. T., Schmitt, F. A. & Van Eldik, L. J. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front. Genet*. **5**, 1–23 (2014).
[3] https://www.jax.org/strain/006293 (Website of Jackson, the supplier of this mouse strain)
[4] Cheng, I. H., Scearce-Levie, K., Legleiter, J., Palop, J. J., Gerstein, H., Bien-Ly, N., … Mucke, L. (2007). Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *J Biol Chem*, **282**(**33**), 23818–23828. http://doi.org/10.1074/jbc.M701078200

C. Re-use

Will the animals be re-used?

X No, continue with question D.

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

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

X No

☐ Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. 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: These experiments cannot be performed without the use of animals. These tests require the use of subjects that are able to learn complex tasks as they have to mimic the complex learning that occurs in humans, this process cannot be modeled in silico or in vitro.

Reduction: Within each testing round, we cannot reduce the number of animals any further due potential loss of power. We will of course stop as soon as we successfully characterized it in the desired test in every group. By first optimizing the tests in adult animals first, we will make it easier to eventually get them working in old animals while using a lower number of animals as compared to the situation in which we would test in aged animals from the start.

Refinement: The automated time-place learning paradigm is a refined version of the manually Time-Place learning paradigm as it does not require the shocks that were used in the manual version. The object recognition tests as well as the automated time-place learning test will include habituation phases to reduce stress by handling or exposure to the test arena or the modified home-cage.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

The object recognition tests as well as the automated time-place learning test will include habituation phases to reduce stress by handling or exposure to the test arena or the modified home-cage. Furthermore, the animals are habituated to handling during a habituation period at the start of each experiment.

We will monitor the weight and food intake of the animals that are being food deprived daily and provide enough food for their bodyweight not to fall below 85% of their original body weight.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

The automated time-place learning apparatus has been developed tested once on technical functioning by our research group. Use of this automated paradigm is a novelty. An extensive literature search revealed that no such an apparatus or voluntary based test paradigm is available.

Repetition: The WWWWtest has been described and succesfully used by other research groups (Davis et al., Journal of Alzheimer's Disease (2013)), but the test is quite complex. To guarantee succesfull implication of the test when we start testing with large numbers of animals in the experiments described in appendices 3, 4 and 5, it is important to optimize the described protocols to make sure that the test can be performed successfully in our facility and using our materials and objects.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

No

X Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

While the animals are housed in the Time Place learning apparatus, they are housed individually so that their behavior can be monitred using a camera system and infra-red sensors.

G. Location where the animals procedures are performed

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

X No > Continue with question H.

☐ 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.

Classification of discomfort / humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

X No > Continue with question I.

☐ 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.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Animals that are used in the Time-Place learning paradigm will lose weight and may experience mild stress and discomfort due to the food restriction or falling from of one of the platforms.

Explain why these effects may emerge.

Food deprivation that is used to motivate the mice in the automated time-place learning task will induce adverse effects on the animals welfare. Furthermore, animal may experience mild stress after they make an error and the platform topples over and they fall down over a small distance.

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

The adverse welfare effects due to food restriction and falling during the automated Time-Place learning task cannot be avoided as this is an intrinsic part of the task and a food reward an essential positive reinforcer. We will monitor the weight and food intake of the animals that are being food deprived daily and provide enough food for their bodyweight not to fall below 85% of their original body weight.

A habituation phase is present in both episodic memory tasks. This reduces stress due to handling and exposure to the tests and test arena.

J. 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 K.

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

An animal will be euthanized if a significant decline in general health status arises, indicated by for example a matt and lusterless fur, or by showing signs of pain. Mice will be euthanized if they lose more than 15% bodyweight, show piloerection or show abnormal behavior, like strong decline feeding/drinking,and reluctance to accept handling. We do not expect the animals to reach such a condition as a consequence of the experiments, but adverse health effects may arise sporadically during the aging process of the mice.

Indicate the likely incidence.

5% in aged animals. None of these cases are to be expected in the adult mice.

In the AD model mice (J20 mice) we might expect some morbidity related to the 15% increase in mortality, but the cause of premature death in this line is unknown (so we cannot be certain about increased morbidity).[1]

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

In both episodic memory tests, due to either novelty stress or handling (only in the WWWWtest), we expect mild discomfort. We expect the discomfort level due to food deprivation to be mild as well.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals cannot be re-used for (episodic) learning and memory or behavioral studies if the task is performed succesfully, as they need to be experimentally naïve in order to perform these tasks. Furthermore, brain tissue of the Amyloid AD model mice will be used to confirm AD pathology.

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.

X Yes

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, see 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'.	10500
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Rijksuniversiteit Groningen
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 3 Type of animal procedure: Effects of endurance exercise, strength exercise, physical inactivity and cognitive stimulation in adult and aged mice.

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.

Disclaimer: Apart from the general design, the animal procedures and behavioural tests described here have mostly been described in the same manner before (appendix 1 & 2). Novel test described in the following part are the Morris Water Maze and the Y-maze alternation task, their description and justification is found in the final part of the following section. These paragraphs that discuss tests have been marked by an underlined term for your convenience.

General design

Adult (2-3 months) and aged (14 months) mice will undergo an intervention to induce or reduce physical activity in a specific manner (A change of their home-cage size and/or use of a special lid to reduce activity, or a strength exercise or endurance exercise procedure, see appendix 1), or to induce cognitive stimulation (housing in an enriched environment without a running wheel) or both (combined intervention). These (exercise) interventions will form the different groups that will be compared in each experiment. The interventions will last for 10-12 weeks.

Physical fitness tests will be used to assess muscle strength, stamina, endurance and motor coordination before and after the intervention. (see appendix 1) Similarly, a number of behavioural tests will be used to measure cognitive functioning in various domains including spatial learning, working memory and episodic memory after the intervention. (see appendix 2)

Different cognitive test batteries and physical fitness tests, or no tests, will be used in three separate experimental set-ups (see figure 1):

Experimental set-up 1 - The WWWWtest, Y-maze alteration task and Morris-Water-Maze can be performed in one cognitive test battery on the same animals. These tests are combined with physical fitness tests.
Experimental set-up 2 - For the automated Time-Place learning task we need the animals to be naïve with regard to previous episodic learning tasks like the WWWWtest. Moreover, food deprivation is needed in the Time-Place learning task, but food deprivation would be a confounding factor for the other cognitive tasks. This tests is combined with physical fitness tests which are performed before food deprivation.
Experimental set-up 3 - Groups of mice will receive the same interventions (strength exercise, endurance exercise, inactivity, cognitive stimulation), without the cognition or physical fitness testing. These mice will be sacrificed and their brain tissue, blood, cerebrospinal fluid and muscles will be analysed in the lab to determine how (in)activity interventions affect a number of neuro-molecular output parameters.

Growth factor signalling, tissue analyses and neuro-molecular output parameters (experiment 3):
Primary outcome parameters that will be investigated in the brain include growth factors such as Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) as well as markers for angiogenesis, synaptic plasticity and neurogenesis: These signalling molecules and neuro-molecular processes are known to be pivotal for the effect of endurance exercise on the brain.

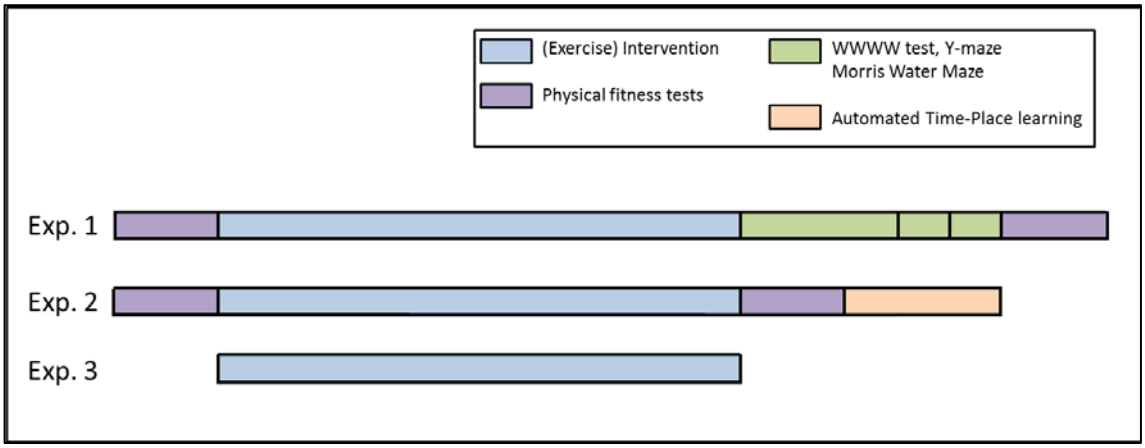


Figure 1. Schematic overview of the 3 experimental set-ups that make use of different (or no) behavioural test batteries.

Primary outcome parameters and related animal procedures: Physical fitness tests (see appendix 1)
The physical fitness tests can be performed subsequent to the cognitive tests. We will investigate whether there are any correlations between physical fitness parameters and cognitive performance.

- Muscle strength will be measured using a grip strength meter. The mice are allowed to hold on to the meter, then the animal is pulled backwards until it releases the grid. Peak force is the primary outcome parameter to measure strength in the forelimbs or in all four limbs respectively.
- Stamina will be measured using the inverted screen test. Animals are placed on a grid, the grid is turned upside down and placed above a padded surface. The time until the animal has to let go of the grid and falls is taken as a measure for stamina.
- Endurance will be measured by running on a treadmill. At the end of lane on the treadmill there is a shock-grid which delivers a shock of ~0.3mA, which is used as a negative reinforce to induce running on the treadmill. In a progressively harder exercise test the animals run until exhaustion. Maximum running speed (Vmax) is taken as the primary outcome measure.
- Motor coordination will be tested in the balance beam test. During this test, the animal is placed on a thin beam or rod, which it has to cross to reach its home-cage. The time needed to cross the beam and

the number of errors (paw-slips) will be taken as primary outcome parameters for coordination.

We use these outcome parameters because they allow us to test whether the (in)activity interventions have resulted in the expected changes in physical functioning in various domains, which will be affected differently by the different interventions.

Primary outcome parameters and related animal procedures: Cognitive tests
We will investigate the effects of the different interventions on different cognitive domains using learning and memory tasks that dependent on different learning and memory systems.

- WWWWtest. *(see appendix 2)* This task has been described in detail in literature[1] and is based on associative and sequential learning and recognition of novel objects and places. The primary outcome parameters for this test are successful discrimination of novel objects, novel locations of familiar objects and association of a certain context and familiar or novel objects.
- The automated Time-Place learning task. *(see appendix 2)* This task will be used to test time-place learning. This type of learning depends on a form of learning and memory which relies on the circadian system.[2] We will use a modified home-cage in which the food deprived animal is able to move around freely. In the upper part of the cage three platforms are located, which may or may not give access to a food reward depending on the time of day. The mouse will fall softly to the bottom of the cage when attempting to cross them at the wrong time of day. The percentage of correct choices is the main output parameter.

- The Morris Water Maze will be used to measure complex forms of spatial learning and memory. Mice are placed in a circular pool and learn to locate a hidden platform. The latency to find the platform as well as the path length to reach the platform will drop over the course of the acquisition trials. This is the primary outcome measure for acquisition of spatial memory. After 48 hours, the mice are placed back in the pool without a platform. The time spent by the mouse in the quadrant where the platform used to be located is the primary outcome measure for retention of spatial memory.
- Working memory will be tested in a Y-maze alternation task. The animal will be placed in a Y-maze, containing three identical arms separated at 120 degree angles from each other. When an animal has intact working memory it will remember which arm it has visited recently. It will explore the three arms more or less subsequently, visiting all three arms approximately the same number of times. The order of the arm exploration is an outcome parameter used to measure working memory.

Justification cognitive tests:
- Episodic memory has been shown to be affected by aging and AD in humans, and in mouse models of AD.[1,3] It is unknown whether exercise interventions can ameliorate these effects. The inclusion of both the object recognition based episodic memory tasks and the Time-Place learning task (dependent on the circadian system) is warranted because both test different forms of episodic memory, which rely on different memory systems. Giving the fast decline in circadian functioning that comes with age, it is important to include circadian system dependent episodic memory tasks.[4]
- These various learning and memory tests allows us to investigate how different memory systems are affected by exercise interventions, inactivity and cognitive stimulation. Performance in the simple object recognition tasks and the Morris Water Maze has been previously shown to be positively affected by voluntary running and an enriched environment and negatively affected by aging. It will therefore be of interest to see whether other forms of physical activity may affect the same learning and memory systems.

References:
[1] Davis, K. E., Easton, A., Eacott, M. J. & Gigg, J. Episodic-like memory for what-where-which occasion is selectively impaired in the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **33,** 681–98 (2013).
[2] [redacted]
[3] Dubois, B. *et al.* Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol.* **9,** 1118–1127 (2010).
[4] Kondratova, A. a & Kondratov, R. V. The circadian clock and pathology of the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci*. **13**, 325–35 (2012).

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

Disclaimer: The animal procedures and behavioural tests described here have mostly been described before (appendix 1 & 2). Novel test described in the following part are the Morris Water Maze and the Y-maze alteration task, their description and justification is found in the final part of the following section. These paragraphs that discuss these tests have been marked by an underlined term for your convenience.

(Exercise) Intervention methods
One of the inactivity methods and one of the strength exercise methods described in appendix 1 will be selected. Depending on whether the inactivity and strength methods are voluntary or forced, voluntary running or treadmill running will be used to serve as a model for endurance exercise.

Cognitive stimulation will be induced using an enriched environment. An enriched environment will consist of a larger cage filled with a number of objects and maze-like parts that are arranged differently every week. This environment will not contain a running wheel in the cognitive stimulation intervention, but will contain a running wheel in the combined intervention.[2]

All of these methods will be implemented for a period of 10-12 weeks before cognitive testing will commence.

Duration and frequency of physical fitness tests (See appendix 1)
- The grip strength test consists of two sessions: a total of four forelimb measurements and four forelimb & hind limb measurements. Each measurement takes approximately 10 seconds with breaks of 1 minute in between trials and a break of 2,5 minutes between sessions, adding up to a total duration of approximately 15 minutes.
- The inverted screen test starts with a 5 minute habituation period and consists of two trials with a 10 minute break in between trials. This break has proven sufficient to prevent any possible effects of fatigue in previously performed tests. Depending on how long the mouse can hold on to the screen, this test may take up to 50 minutes in total.
- Depending on the number of beams and rods that are included, the balance beam test can take 10-30 minutes. Addition of rods and beams that are of different width and shape can improve the ability of the test to discriminate between different exercise regimes. For every beam three trials will be performed, with 30 second breaks between them. Between two different beams, there will be a break of 1,5 minutes. This break has proven sufficient to prevent any possible effects of fatigue in previously performed tests.
- The treadmill endurance test consists of one trial. The duration of this trial is dependent on the endurance of the mouse and may take up to 45 minutes in total. The test is performed until exhaustion, which is classified as staying on the shock grid for 10 seconds despite prodding by the researcher. Early signs of fatigue are lowering of the tail and failing to run in the front part of the treadmill. Two days before the actual endurance test, a habituation trial of 12 minutes is performed to reduce novelty stress during the test.

Duration and frequency of cognitive tests (description of the tests is given in the part above)
- The different object recognition tasks will be tested over the course of 25 days, including 5 days of habituation.[1] These days include several habituation days, acquisition days and testing days. On each day, the animal will spend a total 10 minutes in the testing arena.
- The manual version of the time place learning test takes up to 21 days. We may assume the automated version will take as long, but this will need to be tested.
- In the Morris water maze an animal will be subjected to 4 trials (of maximum 8-10 minutes) per day, over the course of 5-7 days (until the animals has learned the task). Each trial will be finished when the mouse has located the platform and a trial. Probe tests will take place 48 hours after the last acquisition day, and will take 8 minutes per animal.
- The Y-maze alternation task takes a total of 8 minutes per animal.

Justification of selected approaches
The 10-12 weeks (exercise) intervention period is chosen based on literature and results from a first series of studies we performed.[1] Apart from the automated Time-Place learning task, the cognitive tests that are being performed have a standardized design which has been shown to give optimal results by our group and others. The protocol of the automated Time-Place learning task will be optimized using the results obtained from the experiments described in appendix 2. We will shorten the duration of this task as much as possible.

References:
[1] [redacted]
Unpublished results, [redacted]
[2] van Praag, H., Kempermann, G. & Gage, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* **2,** 266–270 (1999).

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

Behavioural testing experimental set-up (1 & 2)
A mixed repeated measures design is possible for the physical fitness tests, but not for the cognitive tests (the performance of the same test twice poses a confounding factor because learning performing the same cognitive tasks in the same setting will become easier every time a cognitive test is repeated). A power analyses for a one-way ANOVA (based on a large effect size (f=0.4), an alpha of 0.05 and beta of 0.8) revealed a total of 80 mice is needed to test five groups (n=16 per group) and a total of 73 animals is needed to test four groups (n=19 per group, rounded up). The groups that are needed are listed in section B.

Because many of the interventions and the automated Time-Place learning test have not been used before, we cannot determine the exact expected effect sizes from literature (the above effect size is an educated guess based on voluntary running studies). We will adjust our power analyses based on effect sizes and expected variation in primary outcome parameters based on studies that are being performed currently and the studies described in appendices 1 and 2.

Tissue analysis experimental set-up (3)
A power analyses for a one-way ANOVA (based on a larger effect size (f=0.5), an alpha of 0.05 and beta of 0.8) revealed a total of 53 mice is needed to test five groups (n=11 per group, rounded up) and a total of 48 animals is needed to test four groups (n=12 per group). The groups that are needed are listed in section B.

Pseudo-burrowers
We will need an additional group to control for certain elements of the strength exercise method depending on the strength exercise method that is suitable: the addition of pseudo-burrowers when the burrowing is our most promising method. We will adjust our power analyses based observations made (and data collected) in the studies that are being performed currently.[1]

[1] [redacted]
Unpublished results, [redacted]

B. The animals

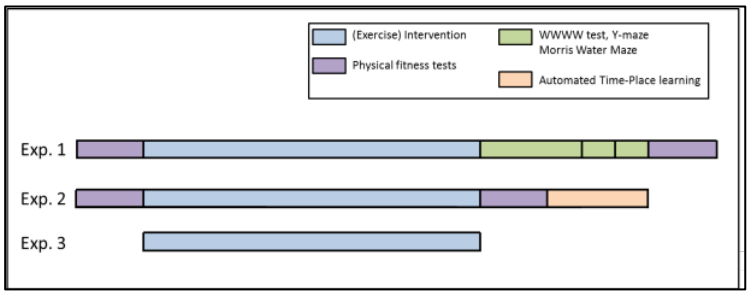
Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

1. Male and female C57Bl6J mice (mus musculus), bred by a certified European breeding company or bred in our own facilities, both adult (2-3 months old) and old (14 months) mice will be used. A maximum of n=518 adult and n=578 aged mice will be used (most conservative estimates calculated below).

Estimated numbers

Groups (A) - To investigate the effects of physical inactivity and various exercise regimes, groups of max. 18 adult or 20 aged mice are needed:
1. Home cage controls
2a. Strength Exercise
2b. Pseudo strength exercise (if burrowing is strength exercise method)
3. Inactive
4. Endurance exercise (voluntary or treadmill running)
5. Endurance exercise + strength exercise

Groups (B) - To investigate differential effects of cognitive stimulation, aerobic exercise and a combination of both, groups of max. 21 adult or 23 aged mice are needed:
1. Home-cage control
2. Enriched environment
3. Endurance exercise (voluntary running)
4. Endurance exercise + enriched environment (combined intervention)



Experimental set-up 1, 2 and 3 (see scheme on the right and section A) will be performed with groups A and B. So in total six experiments will be performed.

Because of practical limitations, we cannot test more than six of these groups in one experimental set-up. We need to perform three separate experiments: One to test for the effects of these interventions on Time-Place learning, one to test the effects in the other cognitive domains, one without behavioral tests for tissue collection. (see the first part of section A).

Calculations
- Groups of 16 or 19 mice are needed to test cognition of 5 or 4 groups under ideal conditions. If the selected exercise methods are voluntary, an additional 2 mice may need to be added to ensure at least 16 or 19 mice perform the desired behaviour (Based on our observations made for (resistance) running and burrowing).
- Due to mortality that comes with the aging process we are likely to lose up to 5% of the animals. An additional 5% of the mice are expected to show signs of morbidity that come with age and which may confound results via systemic effects on the brain and behavior (e.g. development of stereotypic behavior, seizures, or tumor development).

Therefore we will include max (16+2=) 18 or (19+2=) 21 animals per group when behavioral testing adult mice and (16+2+5%+5%=) 20 or (19+2+5%+5%=) 23 animals per group when behavioral testing in aged mice.

- Finally, for both adult and aged mice groups of mice that will not be tested in any of the cognitive tests will be included to collect brain tissue for immuno-histochemical analyses. (experimental set-up 3) These group sizes are smaller, but subject to the same alterations as the groups that are behaviourally tested: Addition of 2 animals for some voluntary methods and 5% mortality and 5% morbidity in aged animals.

Therefore we will include max (11+2=) 13 or (12+2=) 14 animals per group when testing adult mice or (11+2+5%+5%) 15 or (12+2+5%+5%=)16 animals per group when testing in aged mice.

In our most conservative scenario, which will be adjusted to include fewer animals wherever possible, this adds up to:

Groups (A) experimental set-up 1 + 2
- 5 groups*18 = 90 adult mice per experiment (=180)
Or, when Pseudo-Burrowing is added:

Groups (A) experimental set-up 3:
- 5 groups*13 = 65 adult mice
Or, when Pseudo-Burrowing is added:

- 6 groups*18 = 108 adult mice per experiment (=216)
And:
- 5 groups*20 = 100 aged mice per experiment (=200)
Or, when Pseudo-Burrowing is added:
- 6 groups*20 = 120 aged mice per experiment (=240)

Groups (B) experimental set-up 1 + 2
- 4 groups*21 = 84 adult mice per experiment (=168)
And
- 4 groups*23 = 92 aged mice per experiment (=184)

- 6 groups*13 = 78 adult mice
And:
- 5 groups*15 = 75 aged mice
Or, when Pseudo-Burrowing is added:
- 6 groups*15 = 90 aged mice

Groups (B) experimental set-up 3:
- 4 groups*14 = 56 adult mice

- 4 groups*16 = 64 aged mice

C. Re-use

Will the animals be re-used?

X No, continue with question D.

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

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

X No

☐ Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. 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: These experiments cannot be performed without the use of animals. The experiments require the use of complex animal models as they have to mimic the effects that the interventions may have in humans: There are no other models available that can be used to mimic the complex physiological adaptations in body (and brain) that are the consequence of cognitive and physical (in)activity. Moreover, no known *in silico* or *in vitro* models are available to mimic complex learning and memory as is measured by the various cognitive tasks.

Reduction: We cannot reduce the number of animals any further due potential loss of power. We will minimize the number of animals needed as much as possible by optimizing the tests that are used as described in appendices 1 and 2. We will adjust our power analyses and therefore the group size according to the results of those studies.

Refinement: Refinement: We aim to develop (exercise) interventions based on voluntary behaviour. This reduces stress due to handling as compared to forced methods. Habituation is used in behavioural tests. Furthermore, the shock intensity used in the treadmill test has been optimized in a previously performed pilot experiment and is set as low as possible (while still being a strong enough stimulus). The automated time-place learning paradigm is a refined version of the manually Time-Place learning paradigm: It does not require shocks as negative reinforcers, as was the case in the manual version.

Depending on the results of experiments described in Appendix 1, we may be able to characterize the effects of our interventions and exercise regimes mainly based on tissue analyses rather than behavioural testing (e.g. muscle weight instead of the grip strength test). We will need to confirm that this is possible in these studies, but if it is possible we will reduce the number of physical fitness tests as much as possible to further minimize discomfort (without compromising our read-out of physical fitness).

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

The behavioural tests will include habituation phases to reduce stress by handling animals or exposure to the test arena or the modified home-cage. Furthermore, all animals are habituated to handling and the

behavioural test room before the start of behavioural testing.

We will monitor the weight and food intake of the animals that are being food deprived daily and provide enough food for their bodyweight not to fall below 85% of their original body weight.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

A literature search was used to identify existing exercise methods and their effects on the brain. We found that the effects of strength exercise or induced inactivity have scarcely been tested in rodents and that there are no well-characterized (voluntary) strength exercise methods available for mice at this moment. The effects of exposure to an enriched environment and the effects of endurance exercise on spatial memory have been tested before in both adult and aged mice. However, we need to include these groups in order to make a direct comparison between these existing interventions and our novel and combined interventions. Moreover, the effects of running or exposure to an enriched environment on episodic memory have not been investigated in detail, and not at all with respect to circadian Time-Place Association.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

☐ No

X Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

The animals will be housed individually during the (exercise) intervention because it is necessary to monitor the physical activity of the individual. (e.g. amount burrowed or distance run)

G. Location where the animals procedures are performed

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

X No > Continue with question H.

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.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

Animals may experience mild pain during the treadmill running test due to the mild electrical shock which is used as a negative reinforcer. This pain cannot be relieved, this would compromise the treadmill endurance test.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Animals may be mildly stressed by the treadmill exercise and by our novel method of induced inactivity. They may be moderately stressed by the treadmill endurance test. During other behavioural tests animals may experience discomfort/novelty stress induced by handling and exposure to test arena's or apparatus. Moreover, animals that are used in the Time-Place learning paradigm will lose weight and may experience mild stress or discomfort due to the food restriction or falling from the platforms on a soft surface.

Explain why these effects may emerge.

We expect no adverse effects on animal welfare during any of the voluntary exercise interventions, as these interventions are based on enriching the environment of the animal.

With regard to the inactivity method, we may expect that the housing in a smaller cage or a cage without climbing possibilities will adversely affect the welfare of the animal to some extend as it cannot fully engage in natural forms of locomotor activity.

We expect treadmill running to induce mild stress induced by the shock grid at the end of the treadmill lanes. The treadmill endurance test may exert moderate discomfort because of running until exhaustion combined with the use of shocks.

Animals experience novelty stress when exposed to an unfamiliar environment, this is likely to occur in any of the test arena's we use. In the Morris Water Maze, some additional discomfort arises due to the forced swimming that is part of the maze protocol (mice are not particularly fond of swimming).

Finally, the food deprivation that is used to motivate the mice in the automated time-place learning task will induce adverse effects on the animals welfare due to a reduced caloric intake, weight loss and hunger.

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

The possible adverse welfare effects of the inactivity method cannot be avoided as this is an intrinsic part of the method. However, we will carefully monitor the inactivity groups to ensure they do not exert stereotypical behaviour (already when testing the method as indicated in appendix 1, but also during the experiments described in the current appendix). It is of note that our pilot experiments did not reveal that this temporary increase in inactivity causes abnormal overt behaviour.

The adverse welfare effects due to food restriction and falling during the automated Time-Place learning task cannot be avoided as this is an intrinsic part of the task and a food reward an essential positive reinforcer. We will monitor the weight and food intake of the animals that are being food deprived daily and provide enough food for their bodyweight not to fall below 85% of their original body weight.

A habituation phase is present in all our behavioural tests whenever it is possible, including the Morris Water Maze. This reduces stress due to handling and exposure to the tests.

A habituation phase can assure the animals get used to running in the treadmill at a low pace, reducing stress and discomfort to some extent. We cannot replace the foot shock as it is essential to motivate the animals. (Animals will habituate to and eventually ignore prodding by the researcher, for example.) Careful monitoring of the animals during the treadmill endurance test ensures they are placed back in their home cage as soon as they are exhausted.

J. 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 K.

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

An animal will be euthanized if a significant decline in general health status arises, indicated by for example a matt and lustreless fur, or by showing signs of pain. Mice will be euthanized if they lose more than 15% bodyweight, show piloerection or show abnormal behaviour, like a strong decline feeding/drinking, and reluctance to accept handling. We do not expect the animals to reach such a condition as a consequence of the experiments, but adverse health effects may arise sporadically during the aging process of the mice.

Indicate the likely incidence.

5% in the aged groups. None of these cases are to be expected in the adult mice.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

Any of the behavioural tasks apart from the Time-Place learning test, because of novelty stress and the use of a mild shock in the treadmill test: 'Mild'. The automated time-place learning test, because of the food deprivation: 'Mild'

The treadmill endurance tests results in 'Moderate' discomfort due to the use of exhaustion as an endpoint in the test.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

All animals will be killed to collect muscle tissue, fat pads and the hearth, which are needed to confirm the physiological effects of the (in)activity intervention.

The animals that undergo experimental set-up 3 (no behavioral testing) need to be killed in order to take out brain tissue for detailed (immuno-histochemical) analyses.

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.

X Yes

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, see 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'.	10500
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Rijksuniversiteit Groningen
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 4 Type of animal procedure: Effects of endurance exercise, strength exercise, physical inactivity and cognitive stimulation in hAPOE4 mice.

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.

Disclaimer: The animal procedures and behavioural tests described here have been described in the exact same manner as in appendix 3 (copy-paste). This was done because this experiment is exactly the same in terms of set-up and behavioural tests being performed, the only difference is the fact that we use human APOE mice. The paragraphs that discuss additional output parameters and set-up that will be used have been marked by an underlined term for your convenience.

General design

Aged female (14 months) transgenic human APOEe4 and human APOEe3 mice will be used. This age was chosen because a clear cognitive phenotype emerges at 14 months in female hAPOE4 mice.[1] We will investigate whether (exercise) interventions influence this phenotype in terms of functional changes (learning and memory) as well as changes on a neuro-molecular level. hAPOEe3 mice will serve as controls for the hAPOEe4 mice because murine APOE is not comparable in function and structure to the ''neutral '' hAPOEe3 in humans. Clear effects of APOE4 genotype on (age-related) cognitive decline are found in female, but not male mice.[1] Similarly, in humans the increased risk of AD in APOE4 carriers seems restricted to females.[2] Hence, we will test in female mice only.

These mice will undergo an intervention to induce or reduce physical activity in a specific manner (A change of their home-cage size and/or use of a special lid to reduce activity, or a strength exercise or endurance exercise procedure, see appendix 1) or to induce cognitive stimulation (housing in an enriched environment without a running wheel) or both (combined intervention). These (exercise) interventions will form the different groups that will be compared in each experiment. The interventions will last for

10-12 weeks.

Physical fitness tests will be used to assess muscle strength, stamina, endurance and motor coordination before and after the intervention. (see appendix 1) Similarly, a number of behavioural tests will be used to measure cognitive functioning in various domains including spatial learning, working memory and episodic memory after the intervention. (see appendix 2)

Different cognitive test batteries and physical fitness tests, or no tests, will be used in three separate experimental set-ups (see figure 1):

Experimental set-up 1 - The WWWWtest, Y-maze alteration task and Morris-Water-Maze can be performed in one cognitive test battery on the same animals. These tests are combined with physical fitness tests.
Experimental set-up 2 - For the automated Time-Place learning task we need the animals to be naïve with regard to previous episodic learning tasks like the WWWWtest. Moreover, food deprivation is needed in the Time-Place learning task, but food deprivation would be a confounding factor for the other cognitive tasks. This tests is combined with physical fitness tests which are performed before food deprivation.
Experimental set-up 3 - Groups of mice will receive the same interventions (strength exercise, endurance exercise, inactivity, cognitive stimulation), without the cognition or physical fitness testing. These mice will be sacrificed and their brain tissue, blood, cerebrospinal fluid and muscles will be analysed in the lab to determine how (in)activity interventions affect a number of neuro-molecular output parameters.

Growth factor signalling, tissue analyses and neuro-molecular output parameters (experiment 3):
Primary outcome parameters that will be investigated in the brain include growth factors such as Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) as well as markers for angiogenesis, synaptic plasticity and neurogenesis: These signalling molecules and neuro-molecular processes are known to be pivotal for the effect of endurance exercise on the brain.

In addition, specific markers for the APOEe4 phenotype will be investigated: These include ApoE receptors found in the brain and on the blood-brain barrier, lipoprotein vesicle concentrations in the serum and atherosclerotic plaques found in the vasculature.

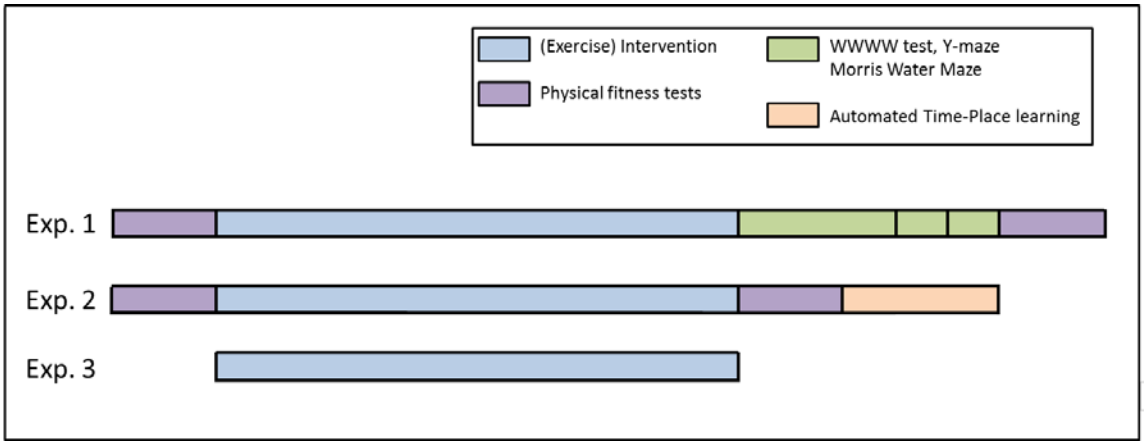


Figure 1. Schematic overview of the 3 experimental set-ups that make use of different (or no) behavioural test batteries.

Primary outcome parameters and related animal procedures: Physical fitness tests (see appendix 1)
The physical fitness tests can be performed subsequent to the cognitive tests. We will investigate whether there are any correlations between physical fitness parameters and cognitive performance.

- Muscle strength will be measured using a grip strength meter. The mice are allowed to hold on to the

meter, then the animal is pulled backwards until it releases the grid. Peak force is the primary outcome parameter to measure strength in the forelimbs or in all four limbs respectively.
- Stamina will be measured using the inverted screen test. Animals are placed on a grid, the grid is turned upside down and placed above a padded surface. The time until the animal has to let go of the grid and falls is taken as a measure for stamina.
- Endurance will be measured by running on a treadmill. At the end of lane on the treadmill there is a shock-grid which delivers a shock of ~0.3mA, which is used as a negative reinforce to induce running on the treadmill. In a progressively harder exercise test the animals run until exhaustion. Maximum running speed (Vmax) is taken as the primary outcome measure.
- Motor coordination will be tested in the balance beam test. During this test, the animal is placed on a thin beam or rod, which it has to cross to reach its home-cage. The time needed to cross the beam and the number of errors (paw-slips) will be taken as primary outcome parameters for coordination.

We use these outcome parameters because they allow us to test whether the (in)activity interventions have resulted in the expected changes in physical functioning in various domains, which will be affected differently by the different interventions.

Primary outcome parameters and related animal procedures: Cognitive tests
We will investigate the effects of the different interventions on different cognitive domains using learning and memory tasks that dependent on different learning and memory systems.

- WWWWtest. *(see appendix 2)* This task has been described in detail in literature[1] and is based on associative and sequential learning and recognition of novel objects and places. The primary outcome parameters for this test are successful discrimination of novel objects, novel locations of familiar objects and association of a certain context and familiar or novel objects.
- The automated Time-Place learning task. *(see appendix 2)* This task will be used to test time-place learning. This type of learning depends on a form of learning and memory which relies on the circadian system.[2] We will use a modified home-cage in which the food deprived animal is able to move around freely. In the upper part of the cage three platforms are located, which may or may not give access to a food reward depending on the time of day. The mouse will fall softly to the bottom of the cage when attempting to cross them at the wrong time of day. The percentage of correct choices is the main output parameter.

- The Morris Water Maze will be used to measure complex forms of spatial learning and memory. Mice are placed in a circular pool and learn to locate a hidden platform. The latency to find the platform as well as the path length to reach the platform will drop over the course of the acquisition trials. This is the primary outcome measure for acquisition of spatial memory. After 48 hours, the mice are placed back in the pool without a platform. The time spent by the mouse in the quadrant where the platform used to be located is the primary outcome measure for retention of spatial memory.
- Working memory will be tested in a Y-maze alternation task. The animal will be placed in a Y-maze, containing three identical arms separated at 120 degree angles from each other. When an animal has intact working memory it will remember which arm it has visited recently. It will explore the three arms more or less subsequently, visiting all three arms approximately the same number of times. The order of the arm exploration is an outcome parameter used to measure working memory.

Justification cognitive tests:
- Episodic memory has been shown to be affected by aging and AD in humans, and in mouse models of AD.[1,3] It is unknown whether exercise interventions can ameliorate these effects. The inclusion of both the object recognition based episodic memory tasks and the Time-Place learning task (dependent on the circadian system) is warranted because both test different forms of episodic memory, which rely on different memory systems. Giving the fast decline in circadian functioning that comes with age, it is important to include circadian system dependent episodic memory tasks.[4]
- These various learning and memory tests allows us to investigate how different memory systems are affected by exercise interventions, inactivity and cognitive stimulation. Performance in the simple object recognition tasks and the Morris Water Maze has been previously shown to be positively affected by voluntary running and an enriched environment and negatively affected by APOEe4 genotype in mice. It

will therefore be of interest to see whether other forms of physical activity may affect the same learning and memory systems.

References:
[1] Davis, K. E., Easton, A., Eacott, M. J. & Gigg, J. Episodic-like memory for what-where-which occasion is selectively impaired in the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **33,** 681–98 (2013).
[2] [redacted]
[3] Dubois, B. *et al.* Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol.* **9,** 1118–1127 (2010).
[4] Kondratova, A. a & Kondratov, R. V. The circadian clock and pathology of the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci*. **13**, 325–35 (2012).

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

Disclaimer: The animal procedures and behavioural tests described here have been described in the exact same manner as in appendix 3 (copy-paste). This was done because this experiment is exactly the same in terms of set-up and behavioural tests being performed, the only difference is the fact that we use human APOE mice.

(Exercise) Intervention methods
One of the inactivity methods and one of the strength exercise methods described in appendix 1 will be selected. Depending on whether the inactivity and strength methods are voluntary or forced, voluntary running or treadmill running will be used to serve as a model for endurance exercise.

Cognitive stimulation will be induced using an enriched environment. An enriched environment will consist of a larger cage filled with a number of objects and maze-like parts that are arranged differently every week. This environment will not contain a running wheel in the cognitive stimulation intervention, but will contain a running wheel in the combined intervention.[2]

All of these methods will be implemented for a period of 10-12 weeks before cognitive testing will commence.

Duration and frequency of physical fitness tests (As described in appendix 1)
- The grip strength test consists of two sessions: a total of four forelimb measurements and four forelimb & hind limb measurements. Each measurement takes approximately 10 seconds with breaks of 1 minute in between trials and a break of 2,5 minutes between sessions, adding up to a total duration of approximately 15 minutes.
- The inverted screen test starts with a 5 minute habituation period and consists of two trials with a 10 minute break in between trials. This break has proven sufficient to prevent any possible effects of fatigue in previously performed tests. Depending on how long the mouse can hold on to the screen, this test may take up to 50 minutes in total.
- Depending on the number of beams and rods that are included, the balance beam test can take 10-30 minutes. Addition of rods and beams that are of different width and shape can improve the ability of the test to discriminate between different exercise regimes. For every beam three trials will be performed, with 30 second breaks between them. Between two different beams, there will be a break of 1,5 minutes. This break has proven sufficient to prevent any possible effects of fatigue in previously performed tests.
- The treadmill endurance test consists of one trial. The duration of this trial is dependent on the endurance of the mouse and may take up to 45 minutes in total. The test is performed until exhaustion, which is classified as staying on the shock grid for 10 seconds despite prodding by the researcher. Early signs of fatigue are lowering of the tail and failing to run in the front part of the treadmill. Two days before the actual endurance test, a habituation trial of 12 minutes is performed to reduce novelty stress during the test.

Duration and frequency of cognitive tests (description of the tests is given in the part above)
- The different object recognition tasks will be tested over the course of 25 days, including 5 days of habituation.[1] These days include several habituation days, acquisition days and testing days. On each day, the animal will spend a total 10 minutes in the testing arena.

- The manual version of the time place learning test takes up to 21 days. We may assume the automated version will take as long, but this will need to be tested.
- In the Morris water maze an animal will be subjected to 4 trials (of maximum 8-10 minutes) per day, over the course of 5-7 days (until the animals has learned the task). Each trial will be finished when the mouse has located the platform and a trial. Probe tests will take place 48 hours after the last acquisition day, and will take 8 minutes per animal.
- The Y-maze alternation task takes a total of 8 minutes per animal.

Justification of selected approaches
The 10-12 weeks (exercise) intervention period is chosen based on literature and results from a first series of studies we performed.[1] Apart from the automated Time-Place learning task, the cognitive tests that are being performed have a standardized design which has been shown to give optimal results by our group and others. The protocol of the automated Time-Place learning task will be optimized using the results obtained from the experiments described in appendix 2. We will shorten the duration of this task as much as possible.

References:
[1] [redacted]
Unpublished results, [redacted]

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

Disclaimer: The animal procedures and behavioural tests described here have been described in the exact same manner as in appendix 3 (copy-paste). This was done because this experiment is exactly the same in terms of set-up and behavioural tests being performed, the only difference is the fact that we use human APOE mice. Additional information is underlined for your convenience.

A mixed repeated measures design is possible for the physical fitness tests, but not for the cognitive tests (the performance of the same test twice poses a confounding factor because learning performing the same cognitive tasks in the same setting will become easier every time a cognitive test is repeated). A power analyses for a one-way ANOVA (based on a large effect size (f=0.4), an alpha of 0.05 and beta of 0.8) revealed a total of 80 mice is needed to test five groups (n=16 per group) and a total of 73 animals is needed to test four groups (n=19 per group, rounded up). This power analysis takes into account that we wish to investigate a possible interaction between genotype (APOEe3 or APOEe4) and (exercise) intervention type. The groups that are needed are listed in section B.

Because many of the interventions and the automated Time-Place learning test have not been used before, we cannot determine the exact expected effect sizes from literature (the above effect size is an educated guess based on voluntary running studies and the few studies performed with APOEe4 mice). We will adjust our power analyses based on effect sizes and expected variation in primary outcome parameters based on studies that are being performed currently and the studies described in appendices 1 and 2.

Tissue analysis experimental set-up (3)
A power analyses for a one-way ANOVA (based on a larger effect size (f=0.5), an alpha of 0.05 and beta of 0.8) revealed a total of 53 mice is needed to test five groups (n=11 per group, rounded up) and a total of 48 animals is needed to test four groups (n=12 per group). The groups that are needed are listed in section B.

Pseudo-burrowers
We will need an additional group to control for certain elements of the strength exercise method depending on the strength exercise method that is suitable: the addition of pseudo-burrowers when the burrowing is our most promising method. We will adjust our power analyses based observations made (and data collected) in the studies that are being performed currently.[1]

References:
[1] [redacted]
Unpublished results, [redacted]

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

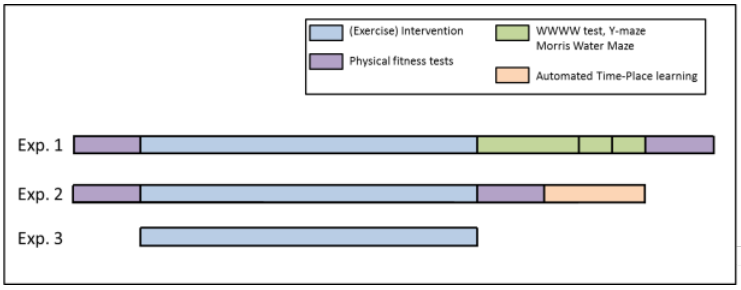
1. Female human APOEe4 and human APOEe3 mice[1,2] (C57Bl6J background, mus musculus), bred in our own facilities, 14 months old mice will be used. A maximum of n=578 hAPOEe4 and n=578 hAPOEe3 mice (most conservative estimates calculated below).

Disclaimer: Due to the similarity in set-up, calculations shown below are the similar compared to those shown in appendix 3. The two changes is that only aged mice are used in the currently described experiments and that we use hAPOE mice , additional information about these mice is <u>underlined</u> for your convenience.

Estimated numbers

Groups (A) - To investigate the effects of physical inactivity and various exercise regimes, groups of max. <u>20 APOEe3 or APOEe4 mice are needed.</u>
1. Home cage controls
2a. Strength Exercise
2b. Pseudo strength exercise (if burrowing is strength exercise method)
3. Inactive
4. Endurance exercise (voluntary or treadmill running)
5. Endurance exercise + strength exercise

Groups (B) - To investigate differential effects of cognitive stimulation, aerobic exercise and a combination of both, groups of max. <u>23 hAPOEe3 or hAPOEe4 mice</u> are needed:
1. Home-cage control
2. Enriched environment
3. Endurance exercise (voluntary running)
4. Endurance exercise + enriched environment (combined intervention)



Experimental set-up 1, 2 and 3 (see scheme on the right and section A) will be performed with groups A and B. So in total six experiments will be performed.

Because of practical limitations, we cannot test more than six of these groups in one experimental set-up. We need to perform three separate experiments: One to test for the effects of these interventions on Time-Place learning, one to test the effects in the other cognitive domains, one without behavioral tests for tissue collection. (see the first part of section A).

Calculations
- Groups of 16 or 19 wild-type mice are needed to test cognition of 5 or 4 groups under ideal conditions. If the selected exercise methods are voluntary, an additional 2 mice may need to be added to ensure at least 16 or 19 mice perform the desired behaviour (Based on our observations made for (resistance) running and burrowing).
<u>- Due to mortality that comes with the aging process we are likely to lose up to 5% of the hAPOEe3 and hAPOEe4 mice. An additional 5% of the mice are expected to show signs of morbidity that come with and which may confound results via systemic effects on the brain and behavior (e.g. development of stereotypic behavior, seizures, or tumor development).</u>

Therefore we will include max <u>(16+2+5%+5%=) 20 or (19+2+5%+5%=) 23 animals per group when</u>

behavioral testing in hAPOEe3 and hAPOEe4 mice.

- Finally, for both hAPOEe3 and hAPOEe4 mice groups of mice that will not be tested in any of the cognitive tests will be included to collect brain tissue for immuno-histochemical analyses. (experimental set-up 3) These group sizes are smaller, but subject to the same alterations as the groups that are behaviourally tested: Addition of 2 mice for some voluntary methods and 5% mortality and 5% morbidity in aged hAPOEe3 and hAPOEe4 mice.

Therefore we will include max (11+2+5%+5%) 15 or (12+2+5%+5%=)16 animals per group when testing in aged hAPOEe3 and hAPOEe4 mice.

In our most conservative scenario, which will be adjusted to include fewer animals wherever possible, this adds up to:

Groups (A) experimental set-up 1 + 2
- 5 groups*20 = 100 APOEe4 mice per experiment (=200)
Or, when Pseudo-Burrowing is added:
- 6 groups*20 = 120 APOEe4 mice per experiment (=240)
And:
- 5 groups*20 = 100 APOEe3 mice per experiment (=200)
Or, when Pseudo-Burrowing is added:
- 6 groups*20 = 120 APOEe3 mice per experiment (=240)

Groups (A) experimental set-up 3:
- 5 groups*15 = 75 APOEe4 mice
Or, when Pseudo-Burrowing is added:
- 6 groups*15 = 90 APOEe4 mice
And:
- 5 groups*15 = 75 APOEe3 mice
Or, when Pseudo-Burrowing is added:
- 6 groups*15 = 90 APOEe3 mice

Groups (B) experimental set-up 1 + 2
- 4 groups*23 = 92 APOEe4 mice per experiment (=184)
And
- 4 groups*23 = 92 APOEe3 mice per experiment (=184)

Groups (B) experimental set-up 3:
- 4 groups*16 = 64 APOEe4 mice
- 4 groups*16 = 64 APOEe3 mice

References:
[1] Knouff, C. *et al.* Apo E structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice. *J. Clin. Invest.* **103,** 1579–86 (1999).
[2] Sullivan, P. M. *et al.* Targeted Replacement of the Mouse Apolipoprotein E Gene with the Common Human APOE3 Allele Enhances Diet-induced Hypercholesterolemia and Atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* **272,** 17972–17980 (1997).

C. Re-use

Will the animals be re-used?

X No, continue with question D.

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

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

x No

☐ Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. 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.

Disclaimer: The information provided in section D has been described in the exact same manner as in appendix 3 (copy-paste). This was done because this experiment is exactly the same in terms of set-up and behavioural tests being performed, the only difference is the fact that we use an human APOE mice. Additional information is underlined for your convenience.

Replacement: These experiments cannot be performed without the use of animals. The experiments require the use of complex animal models as they have to mimic the effects that the interventions may have in humans: There are no other models available that can be used to mimic the complex physiological adaptations in body (and brain) that are the consequence of cognitive and physical

(in)activity. Moreover, no known *in silico* or *in vitro* models are available to mimic complex learning and memory as is measured by the various cognitive tasks. Finally, the interaction between APOE genotype and (exercise) interventions can only be observed *in vivo* as this depends on complex physiological mechanisms with are poorly understood.

Reduction: We cannot reduce the number of animals any further due potential loss of power. We will minimize the number of animals needed as much as possible by optimizing the tests that are used as described in appendices 1 and 2. We will adjust our power analyses and therefore the group size according to the results of those studies.

Refinement: Refinement: We aim to develop (exercise) interventions based on voluntary behaviour. This reduces stress due to handling as compared to forced methods. Habituation is used in behavioural tests. Furthermore, the shock intensity used in the treadmill test has been optimized in a previously performed pilot experiment and is set as low as possible (while still being a strong enough stimulus). The automated time-place learning paradigm is a refined version of the manually Time-Place learning paradigm: It does not require shocks as negative reinforcers, as was the case in the manual version.

Depending on the results of experiments described in Appendix 1, we may be able to characterize the effects of our interventions and exercise regimes mainly based on tissue analyses rather than behavioural testing (e.g. muscle weight instead of the grip strength test). We will need to confirm that this is possible in these studies, but if it is possible we will reduce the number of physical fitness tests as much as possible to further minimize discomfort (without compromising our read-out of physical fitness).

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

The behavioural tests will include habituation phases to reduce stress by handling animals or exposure to the test arena or the modified home-cage. Furthermore, all animals are habituated to handling and the behavioural test room before the start of behavioural testing.

We will monitor the weight and food intake of the animals that are being food deprived daily and provide enough food for their bodyweight not to fall below 85% of their original body weight.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Disclaimer: The information provided in section E has been described in the exact same manner as in appendix 3 (copy-paste). This was done because this experiment is exactly the same in terms of set-up and behavioural tests being performed, the only difference is the fact that we use an human APOE mice. Additional information is underlined for your convenience.

A literature search was used to identify existing exercise methods and their effects on the AD-like phenotype. We found that the effects of strength exercise or induced inactivity have scarcely been tested in rodents and that there are no well-characterized (voluntary) strength exercise methods available for mice at this moment. The effects of exposure to an enriched environment and the effects of endurance exercise on spatial memory and APOEe4 related cognitive decline has been tested only three times in APOEe4 mouse models.[1-3] Mixed results from these studies warrant further investigation and testing using additional learning and memory tests. Moreover, we need to include these groups in order to make a direct comparison between these existing interventions and our novel and combined interventions.

To date, no studies have investigated the effect of (endurance) exercise on episodic memory in hAPOEe4 mice. In fact, the testing of Time-Place association or another form of episodic memory has not been attempted in this hAPOE4 mice at all.

References:
[1] Nichol, K., Deeny, S. P., Seif, J., Camaclang, K. & Cotman, C. W. Exercise improves cognition and hippocampal plasticity in APOE epsilon4 mice. *Alzheimers. Dement.* **5,** 287–94 (2009).
[2] ApoE4 impairs hippocampal plasticity isoform-specifically and blocks the environmental stimulation of synaptogenesis and memory. **13,** 273–282 (2003).
[3] Environmental enrichment stimulates neurogenesis in apolipoprotein E3 and neuronal apoptosis in apolipoprotein E4 transgenic mice. *J. Neurochem.* **100,** 202–10 (2007).

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

☐ No

X Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

The animals will be housed individually during the (exercise) intervention because it is necessary to monitor the physical activity of the individual. (e.g. amount burrowed or distance run)

G. Location where the animals procedures are performed

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

X No > Continue with question H.

☐ 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.

Classification of discomfort / humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

Animals may experience mild pain during the treadmill running test due to the mild electrical shock which is used as a negative reinforcer. This pain cannot be relieved, this would compromise the treadmill endurance test.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Disclaimer: The information provided in section I has been described in the exact same manner as in appendix 3 (copy-paste). This was done because this experiment is exactly the same in terms of set-up and behavioural tests being performed, the only difference is the fact that we use hAPOE mice.

Animals may be mildly stressed by the treadmill exercise and by our novel method of induced inactivity. They may be moderately stressed by the treadmill endurance test. During other behavioural tests animals may experience discomfort/novelty stress induced by handling and exposure to test arena's or apparatus. Moreover, animals that are used in the Time-Place learning paradigm will lose weight and

may experience mild stress or discomfort due to the food restriction or falling from the platforms on a soft surface.

Explain why these effects may emerge.

We expect no adverse effects on animal welfare during any of the voluntary exercise interventions, as these interventions are based on enriching the environment of the animal.

With regard to the inactivity methods, we may expect that the housing in a smaller cage or a cage without climbing possibilities will adversely affect the welfare of the animal to some extend as it cannot fully engage in natural forms of locomotor activity.

We expect treadmill running to induce mild stress induced by the shock grid at the end of the treadmill lanes. The treadmill endurance test may exert moderate discomfort because of running until exhaustion combined with the use of shocks.

Animals experience novelty stress when exposed to an unfamiliar environment, this is likely to occur in any of the test arena's we use. In the Morris Water Maze, some additional discomfort arises due to the forced swimming that is part of the maze protocol (mice are not particularly fond of swimming).

Finally, the food deprivation that is used to motivate the mice in the automated time-place learning task will induce adverse effects on the animals welfare due to a reduced caloric intake, weight loss and hunger.

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

The possible adverse welfare effects of the inactivity method cannot be avoided as this is an intrinsic part of the method. However, we will carefully monitor the inactivity groups to ensure they do not exert stereotypical behaviour (already when testing the method as indicated in appendix 1, but also during the experiments described in the current appendix). It is of note that our pilot experiments did not reveal that this temporary increase in inactivity causes abnormal overt behaviour.

The adverse welfare effects due to food restriction and falling during the automated Time-Place learning task cannot be avoided as this is an intrinsic part of the task and a food reward an essential positive reinforcer. We will monitor the weight and food intake of the animals that are being food deprived daily and provide enough food for their bodyweight not to fall below 85% of their original body weight.

A habituation phase is present in all our behavioural tests whenever it is possible, including the Morris Water Maze. This reduces stress due to handling and exposure to the tests.

A habituation phase can assure the animals get used to running in the treadmill at a low pace, reducing stress and discomfort to some extent. We cannot replace the foot shock as it is essential to motivate the animals. (Animals will habituate to and eventually ignore prodding by the researcher, for example.) Careful monitoring of the animals during the treadmill endurance test ensures they are placed back in their home cage as soon as they are exhausted.

J. 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 K.

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

Disclaimer: The information provided in section J has been described in the exact same manner as in appendix 3 (copy-paste). This was done because this experiment is exactly the same in terms of set-up and behavioural tests being performed, the only difference is the fact that we use an hAPOE mice.

An animal will be euthanized if a significant decline in general health status arises, indicated by for example a matt and lustreless fur, or by showing signs of pain. Mice will be euthanized if they lose more than 15% bodyweight, show piloerection or show abnormal behaviour, like a strong decline

feeding/drinking, and reluctance to accept handling. We do not expect the animals to reach such a condition as a consequence of the experiments, but adverse health effects may arise sporadically during the aging process of the mice.

Indicate the likely incidence.

5% in aged mice, which are all mice described in this appendix.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

Any of the behavioural tasks apart from the Time-Place learning test, because of novelty stress and the use of a mild shock in the treadmill test: 'Mild'. The automated time-place learning test, because of the food deprivation: 'Mild'

The treadmill endurance tests results in 'Moderate' discomfort due to the use of exhaustion as an endpoint in the test.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

All animals will be killed to collect muscle tissue, fat pads and the hearth, which are needed to confirm the physiological effects of the (in)activity intervention. Serum and tissue will be collected to confirm the animals have developed hAPOE4 phenotype (lipoprotein concentrations and possibly atherosclerotic lesions).

The animals that undergo experimental set-up 3 (no behavioral testing) need to be killed in order to take out brain tissue for detailed (immuno-histochemical) analyses.

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.

X Yes

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, see 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'.	10500
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Rijksuniversiteit Groningen
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 5 Type of animal procedure: Effects of endurance exercise, strength exercise, physical inactivity and cognitive stimulation in Amyloid Alzheimer's Disease model mice.

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.

Disclaimer: The animal procedures and behavioural tests described here have been described in the exact same manner as in appendix 3 (copy-paste). This was done because this experiment is exactly the same in terms of set-up and behavioural tests being performed, the only difference is the fact that we use J20 AD-model mice. The paragraphs that discuss additional output parameters and set-up that will be used have been marked by an <u>underlined</u> term for your convenience.

General design

<u>Amyloid Alzheimer's disease model mice, J20 mice</u> (6 months old) will be used. This transgenic model is mimics Amyloid plaque formation which is a pathological hallmark of AD. For further details on this specific strain see section B. This age was chosen because a clear cognitive phenotype and AD pathological hallmarks have just emerged at 6 months.[1] We will investigate whether (exercise) interventions influence the progression of the AD-like phenotype in terms of functional changes (learning and memory) and pathological hallmarks (plaque formation). Wild-type littermates will serve as controls for the J20 AD-model mice.

These mice will undergo an intervention to induce or reduce physical activity in a specific manner (A change of their home-cage size and/or use of a special lid to reduce activity, or a strength exercise or endurance exercise procedure, see appendix 1), or to induce cognitive stimulation (housing in an enriched environment without a running wheel) or both (combined intervention). These (exercise) interventions will form the different groups that will be compared in each experiment. The interventions will last for 10-12 weeks.

Physical fitness tests will be used to assess muscle strength, stamina, endurance and motor coordination before and after the intervention. (see appendix 1) Similarly, a number of behavioural tests will be used to measure cognitive functioning in various domains including spatial learning, working memory and episodic memory after the intervention. (see appendix 2)

Different cognitive test batteries and physical fitness tests, or no tests, will be used in three separate experimental set-ups (see figure 1):

Experimental set-up 1 - The WWWWtest, Y-maze alteration task and Morris-Water-Maze can be performed in one cognitive test battery on the same animals. These tests are combined with physical fitness tests.
Experimental set-up 2 - For the automated Time-Place learning task we need the animals to be naïve with regard to previous episodic learning tasks like the WWWWtest. Moreover, food deprivation is needed in the Time-Place learning task, but food deprivation would be a confounding factor for the other cognitive tasks. This tests is combined with physical fitness tests which are performed before food deprivation.
Experimental set-up 3 - Groups of mice will receive the same interventions (strength exercise, endurance exercise, inactivity, cognitive stimulation), without the cognition or physical fitness testing. These mice will be sacrificed and their brain tissue, blood, cerebrospinal fluid and muscles will be analysed in the lab to determine how (in)activity interventions affect a number of neuro-molecular output parameters.

Growth factor signalling, tissue analyses and neuro-molecular output parameters (experiment 3):
Primary outcome parameters that will be investigated in the brain include growth factors such as Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) as well as markers for angiogenesis, synaptic plasticity and neurogenesis: These signalling molecules and neuro-molecular processes are known to be pivotal for the effect of endurance exercise on the brain.

In addition, specific markers for AD-like pathology will be investigated. These include Amyloid plaque formation detected by immunohistochemistry and $A\beta_{1-42}$ levels in the cerebrospinal fluid and brain tissue detected by western blot.

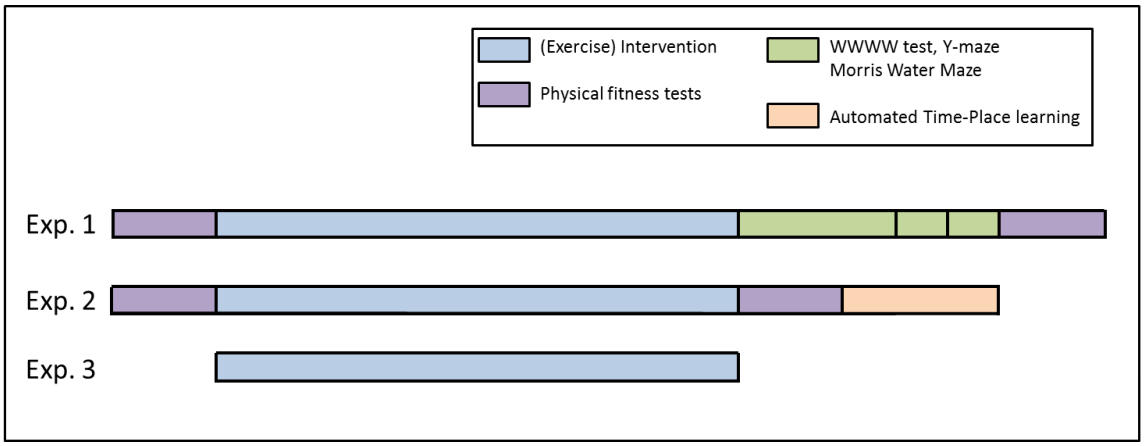


Figure 1. Schematic overview of the 3 experimental set-ups that make use of different (or no) behavioural test batteries.

Primary outcome parameters and related animal procedures: Physical fitness tests (see appendix 1)
The physical fitness tests can be performed subsequent to the cognitive tests. We will investigate whether there are any correlations between physical fitness parameters and cognitive performance.

- Muscle strength will be measured using a grip strength meter. The mice are allowed to hold on to the meter, then the animal is pulled backwards until it releases the grid. Peak force is the primary outcome parameter to measure strength in the forelimbs or in all four limbs respectively.

- Stamina will be measured using the inverted screen test. Animals are placed on a grid, the grid is turned upside down and placed above a padded surface. The time until the animal has to let go of the grid and falls is taken as a measure for stamina.
- Endurance will be measured by running on a treadmill. At the end of lane on the treadmill there is a shock-grid which delivers a shock of ~0.3mA, which is used as a negative reinforce to induce running on the treadmill. In a progressively harder exercise test the animals run until exhaustion. Maximum running speed (Vmax) is taken as the primary outcome measure.
- Motor coordination will be tested in the balance beam test. During this test, the animal is placed on a thin beam or rod, which it has to cross to reach its home-cage. The time needed to cross the beam and the number of errors (paw-slips) will be taken as primary outcome parameters for coordination.

We use these outcome parameters because they allow us to test whether the (in)activity interventions have resulted in the expected changes in physical functioning in various domains, which will be affected differently by the different interventions.

Primary outcome parameters and related animal procedures: Cognitive tests
We will investigate the effects of the different interventions on different cognitive domains using learning and memory tasks that dependent on different learning and memory systems.

- WWWWtest. *(see appendix 2)* This task has been described in detail in literature[1] and is based on associative and sequential learning and recognition of novel objects and places. The primary outcome parameters for this test are successful discrimination of novel objects, novel locations of familiar objects and association of a certain context and familiar or novel objects.
- The automated Time-Place learning task. *(see appendix 2)* This task will be used to test time-place learning. This type of learning depends on a form of learning and memory which relies on the circadian system.[3] We will use a modified home-cage in which the food deprived animal is able to move around freely. In the upper part of the cage three platforms are located, which may or may not give access to a food reward depending on the time of day. The mouse will fall softly to the bottom of the cage when attempting to cross them at the wrong time of day. The percentage of correct choices is the main output parameter.

- The Morris Water Maze will be used to measure complex forms of spatial learning and memory. Mice are placed in a circular pool and learn to locate a hidden platform. The latency to find the platform as well as the path length to reach the platform will drop over the course of the acquisition trials. This is the primary outcome measure for acquisition of spatial memory. After 48 hours, the mice are placed back in the pool without a platform. The time spent by the mouse in the quadrant where the platform used to be located is the primary outcome measure for retention of spatial memory.
- Working memory will be tested in a Y-maze alternation task. The animal will be placed in a Y-maze, containing three identical arms separated at 120 degree angles from each other. When an animal has intact working memory it will remember which arm it has visited recently. It will explore the three arms more or less subsequently, visiting all three arms approximately the same number of times. The order of the arm exploration is an outcome parameter used to measure working memory.

Justification cognitive tests:
- Episodic memory has been shown to be affected by aging and AD in humans, and in mouse models of AD.[2,4] It is unknown whether exercise interventions can ameliorate these effects. The inclusion of both the object recognition based episodic memory tasks and the Time-Place learning task (dependent on the circadian system) is warranted because both test different forms of episodic memory, which rely on different memory systems. Giving the fast decline in circadian functioning that comes with age, it is important to include circadian system dependent episodic memory tasks.[5]
- These various learning and memory tests allows us to investigate how different memory systems are affected by exercise interventions, inactivity and cognitive stimulation. Performance in the simple object recognition tasks and the Morris Water Maze has been previously shown to be positively affected by voluntary running and an enriched environment and negatively affected by AD pathology in mice. It will therefore be of interest to see whether other forms of physical activity may affect the same learning and memory systems.

References:
[1] Webster, S. J., Bachstetter, A. D., Nelson, P. T., Schmitt, F. A. & Van Eldik, L. J. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front. Genet*. **5**, 1–23 (2014).
[2] Davis, K. E., Easton, A., Eacott, M. J. & Gigg, J. Episodic-like memory for what-where-which occasion is selectively impaired in the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **33,** 681–98 (2013).
[3] [redacted]
[4] Dubois, B. *et al.* Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol.* **9,** 1118–1127 (2010).
[5] Kondratova, A. a & Kondratov, R. V. The circadian clock and pathology of the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci*. **13**, 325–35 (2012).

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

Disclaimer: The animal procedures and behavioural tests described here have been described in the exact same manner as in appendix 3 (copy-paste). This was done because this experiment is exactly the same in terms of set-up and behavioural tests being performed, the only difference is the fact that we use J20 AD-model mice.

(Exercise) Intervention methods
One of the inactivity methods and one of the strength exercise methods described in appendix 1 will be selected. Depending on whether the inactivity and strength methods are voluntary or forced, voluntary running or treadmill running will be used to serve as a model for endurance exercise.

Cognitive stimulation will be induced using an enriched environment. An enriched environment will consist of a larger cage filled with a number of objects and maze-like parts that are arranged differently every week. This environment will not contain a running wheel in the cognitive stimulation intervention, but will contain a running wheel in the combined intervention.[2]

All of these methods will be implemented for a period of 10-12 weeks before cognitive testing will commence.

Duration and frequency of physical fitness tests (As described in appendix 1)
- The grip strength test consists of two sessions: a total of four forelimb measurements and four forelimb & hind limb measurements. Each measurement takes approximately 10 seconds with breaks of 1 minute in between trials and a break of 2,5 minutes between sessions, adding up to a total duration of approximately 15 minutes.
- The inverted screen test starts with a 5 minute habituation period and consists of two trials with a 10 minute break in between trials. This break has proven sufficient to prevent any possible effects of fatigue in previously performed tests. Depending on how long the mouse can hold on to the screen, this test may take up to 50 minutes in total.
- Depending on the number of beams and rods that are included, the balance beam test can take 10-30 minutes. Addition of rods and beams that are of different width and shape can improve the ability of the test to discriminate between different exercise regimes. For every beam three trials will be performed, with 30 second breaks between them. Between two different beams, there will be a break of 1,5 minutes. This break has proven sufficient to prevent any possible effects of fatigue in previously performed tests.
- The treadmill endurance test consists of one trial. The duration of this trial is dependent on the endurance of the mouse and may take up to 45 minutes in total. The test is performed until exhaustion, which is classified as staying on the shock grid for 10 seconds despite prodding by the researcher. Early signs of fatigue are lowering of the tail and failing to run in the front part of the treadmill. Two days before the actual endurance test, a habituation trial of 12 minutes is performed to reduce novelty stress during the test.

Duration and frequency of cognitive tests (description of the tests is given in the part above)
- The different object recognition tasks will be tested over the course of 25 days, including 5 days of habituation.[1] These days include several habituation days, acquisition days and testing days. On each day, the animal will spend a total 10 minutes in the testing arena.

- The manual version of the time place learning test takes up to 21 days. We may assume the automated version will take as long, but this will need to be tested.
- In the Morris water maze an animal will be subjected to 4 trials (of maximum 8-10 minutes) per day, over the course of 5-7 days (until the animals has learned the task). Each trial will be finished when the mouse has located the platform and a trial. Probe tests will take place 48 hours after the last acquisition day, and will take 8 minutes per animal.
- The Y-maze alternation task takes a total of 8 minutes per animal.

Justification of selected approaches
The 10-12 weeks (exercise) intervention period is chosen based on literature and results from a first series of studies we performed.[1] Apart from the automated Time-Place learning task, the cognitive tests that are being performed have a standardized design which has been shown to give optimal results by our group and others. The protocol of the automated Time-Place learning task will be optimized using the results obtained from the experiments described in appendix 2. We will shorten the duration of this task as much as possible.

References:
[1] [redacted]
Unpublished results, [redacted]

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

Disclaimer: The animal procedures and behavioural tests described here have been described in the exact same manner as in appendix 3 (copy-paste). This was done because this experiment is exactly the same in terms of set-up and behavioural tests being performed, the only difference is the fact that we use J20 AD-model mice. Additional information is underlined for your convenience.

A mixed repeated measures design is possible for the physical fitness tests, but not for the cognitive tests (the performance of the same test twice poses a confounding factor because learning performing the same cognitive tasks in the same setting will become easier every time a cognitive test is repeated). A power analyses for a one-way ANOVA (based on a large effect size (f=0.4), an alpha of 0.05 and beta of 0.8) revealed a total of 80 mice is needed to test five groups (n=16 per group) and a total of 73 animals is needed to test four groups (n=19 per group, rounded up). This power analysis takes into account that we wish to investigate a possible interaction between genotype (J20 or wild-type) and (exercise) intervention type. The groups that are needed are listed in section B.

Because many of the interventions and the automated Time-Place learning test have not been used before, we cannot determine the exact expected effect sizes from literature (the above effect size is an educated guess based on voluntary running studies and studies performed with J20 mice). We will adjust our power analyses based on effect sizes and expected variation in primary outcome parameters based on studies that are being performed currently and the studies described in appendices 1 and 2.

Tissue analysis experimental set-up (3)
A power analyses for a one-way ANOVA (based on a larger effect size (f=0.5), an alpha of 0.05 and beta of 0.8) revealed a total of 53 mice is needed to test five groups (n=11 per group, rounded up) and a total of 48 animals is needed to test four groups (n=12 per group). The groups that are needed are listed in section B.

Pseudo-burrowers
We will need an additional group to control for certain elements of the strength exercise method depending on the strength exercise method that is suitable: the addition of pseudo-burrowers when the burrowing is our most promising method. We will adjust our power analyses based observations made (and data collected) in the studies that are being performed currently.[1]

[1] [redacted]

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

1. Male and female j20 AD-model mice[1,2] (C57Bl6J background) and C57Bl6J wild-type littermates (mus musculus), bred in our own facilities, 6 months old mice will be used. A maximum of n=602 J20 mice and 518 wild-type mice (most conservative estimates calculated below).

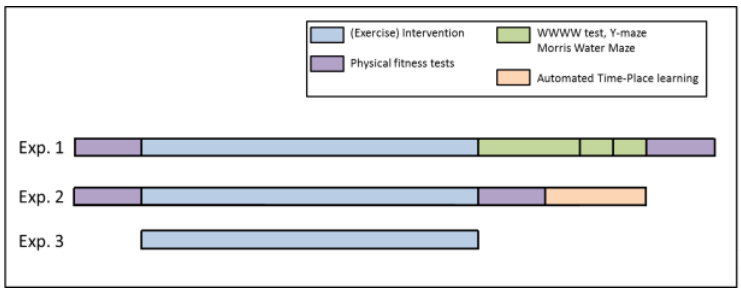
Disclaimer: Due to the similarity in set-up, calculations shown below are the similar compared to those shown in appendix 3. The two changes is that no aged mice are used in the currently described experiments and that we use J20 AD-model mice , additional information about these mice is underlined for your convenience.

Estimated numbers

Groups (A) - To investigate the effects of physical inactivity and various exercise regimes, groups of max. 18 wild-type or 21 J20 mice are needed:
1. Home cage controls
2a. Strength Exercise
2b. Pseudo strength exercise (if burrowing is strength exercise method)
3. Inactive
4. Endurance exercise (voluntary or treadmill running)
5. Endurance exercise + strength exercise

Groups (B) - To investigate differential effects of cognitive stimulation, aerobic exercise and a combination of both, groups of max. 21 wild-type or 25 j20 mice are needed:
1. Home-cage control
2. Enriched environment
3. Endurance exercise (voluntary running)
4. Endurance exercise + enriched environment (combined intervention)

Experimental set-up 1, 2 and 3 (see scheme on the right and section A) will be performed with groups A and B. So in total six experiments will be performed.



Because of practical limitations, we cannot test more than six of these groups in one experimental set-up. We need to perform three separate experiments: One to test for the effects of these interventions on Time-Place learning, one to test the effects in the other cognitive domains, one without behavioral tests for tissue collection. (see the first part of section A).

Calculations
- Groups of 16 or 19 wild-type mice are needed to test cognition of 5 or 4 groups under ideal conditions. If the selected exercise methods are voluntary, an additional 2 mice may need to be added to ensure at least 16 or 19 mice perform the desired behaviour (Based on our observations made for (resistance) running and burrowing).
- We expect to lose 15% of the J20 mice due to increased mortality which is part of the j20 phenotype.[3,4]

Therefore we will include max (16+2=) 18 or (19+2=) 21 animals per group when behavioral testing wild-type mice and (16+2+15%=) 21 or (19+2+15%=) 25 animals per group when behavioral testing in j20 mice.

- Finally, for both wild-type and j20 mice groups of mice that will not be tested in any of the cognitive tests will be included to collect brain tissue for immuno-histochemical analyses. (experimental set-up 3) These group sizes are smaller, but subject to the same alterations as the groups that are behaviourally tested: Addition of 2 animals for some voluntary methods and 15% mortality in J20 mice.

Therefore we will include max (11+2=) 13 or (12+2=)14 animals per group when testing wil-type mice or (11+2+15%=) 15 or (12+2+15%=)17 animals per group when testing in j20 mice.

In our most conservative scenario, which will be adjusted to include fewer animals wherever possible, this adds up to:

Groups (A) experimental set-up 1 + 2
- 5 groups*18 = 90 WT mice per experiment (=180)
Or, when Pseudo-Burrowing is added:
- 6 groups*18 = 108 WT mice per experiment (=216)
And:
- 5 groups*21 = 105 J20 mice per experiment (=210)
Or, when Pseudo-Burrowing is added:
- 6 groups*21 = 126 J20 mice per experiment (=256)

Groups (A) experimental set-up 3:
- 5 groups*13 = 65 WT mice
Or, when Pseudo-Burrowing is added:
- 6 groups*13 = 78 WT mice
And:
- 5 groups*15 = 65 J20 mice
Or, when Pseudo-Burrowing is added:
- 6 groups*15 = 78 J20 mice

Groups (B) experimental set-up 1 + 2
- 4 groups*21 = 84 WT mice per experiment (=168)
And
- 4 groups*25 = 100 J20 mice per experiment (=200)

Groups (B) experimental set-up 3:
- 4 groups*14 = 56 WT mice
- 4 groups*17 = 68 J20 mice

References
[1] Mucke, L. et al. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci*. **20**, 4050–4058 (2000).
[2] Webster, S. J., Bachstetter, A. D., Nelson, P. T., Schmitt, F. A. & Van Eldik, L. J. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front. Genet*. **5**, 1–23 (2014).
[3] https://www.jax.org/strain/006293 (Website of Jackson, the supplier of this mouse strain)
[4] Cheng, I. H., Scearce-Levie, K., Legleiter, J., Palop, J. J., Gerstein, H., Bien-Ly, N., … Mucke, L. (2007). Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *J Biol Chem*, **282**(**33**), 23818–23828. http://doi.org/10.1074/jbc.M701078200

C. Re-use

Will the animals be re-used?

X No, continue with question D.

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

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

XNo

☐ Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. 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.

Disclaimer: The information provided in section D has been described in the exact same manner as in appendix 3 (copy-paste). This was done because this experiment is exactly the same in terms of set-up and behavioural tests being performed, the only difference is the fact that we use J20 AD-model mice. Additional information is underlined for your convenience.

Replacement: These experiments cannot be performed without the use of animals. The experiments require the use of complex animal models as they have to mimic the effects that the interventions may have in humans: There are no other models available that can be used to mimic the complex physiological adaptations in body (and brain) that are the consequence of cognitive and physical (in)activity. Moreover, no known *in silico* or *in vitro* models are available to mimic complex learning and

memory as is measured by the various cognitive tasks. Finally, the AD-like pathology displayed in the J20 mice can only partially be investigated in vitro. Plaque formation and the interaction between physiological changes induced by (exercise) interventions and this AD-like pathology can only be observed *in vivo* as this depends on complex physiological mechanisms with are only partially understood.

Reduction: We cannot reduce the number of animals any further due potential loss of power. We will minimize the number of animals needed as much as possible by optimizing the tests that are used as described in appendices 1 and 2. We will adjust our power analyses and therefore the group size according to the results of those studies.

Refinement: We aim to develop (exercise) interventions based on voluntary behaviour. This reduces stress due to handling as compared to forced methods. Habituation is used in behavioural tests. Furthermore, the shock intensity used in the treadmill test has been optimized in a previously performed pilot experiment and is set as low as possible (while still being a strong enough stimulus). The automated time-place learning paradigm is a refined version of the manually Time-Place learning paradigm: It does not require shocks as negative reinforcers, as was the case in the manual version.

Depending on the results of experiments described in Appendix 1, we may be able to characterize the effects of our interventions and exercise regimes mainly based on tissue analyses rather than behavioural testing (e.g. muscle weight instead of the grip strength test). We will need to confirm that this is possible in these studies, but if it is possible we will reduce the number of physical fitness tests as much as possible to further minimize discomfort (without compromising our read-out of physical fitness).

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

The behavioural tests will include habituation phases to reduce stress by handling animals or exposure to the test arena or the modified home-cage. Furthermore, all animals are habituated to handling and the behavioural test room before the start of behavioural testing.

We will monitor the weight and food intake of the animals that are being food deprived daily and provide enough food for their bodyweight not to fall below 85% of their original body weight.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Disclaimer: The information provided in section E has been described in the exact same manner as in appendix 3 (copy-paste). This was done because this experiment is exactly the same in terms of set-up and behavioural tests being performed, the only difference is the fact that we use J20 AD-model mice. Additional information is underlined for your convenience.

A literature search was used to identify existing exercise methods and their effects on the AD-like phenotype. We found that the effects of strength exercise or induced inactivity have scarcely been tested in rodents and that there are no well-characterized (voluntary) strength exercise methods available for mice at this moment. The effects of exposure to an enriched environment and the effects of endurance exercise on spatial memory and AD-like pathological hallmarks have been tested before in AD mouse models. However, we need to include these groups in order to make a direct comparison between these existing interventions and our novel and combined interventions.

To date, no studies have investigated the effect of (endurance) exercise on episodic memory in Amyloid AD mice (like the j20 mice). The testing of Time-Place association has not been attempted in this AD-model either. Two studies were performed with the ''3xTgAD'' mouse model (which shows tauopathy in addittion to Amyloid plaque formation). These studies showed episodic memory was affected by AD-like pathology, but did not investigate a possible effect of exercise interventions or inactivity.[1,2]

References:
[1] Davis, K. E., Easton, A., Eacott, M. J. & Gigg, J. Episodic-like memory for what-where-which occasion is selectively impaired in the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease. J. Alzheimers. Dis. **33**, 681–98 (2013).
[2] Davis, K. E., Eacott, M. J., Easton, A. & Gigg, J. Episodic-like memory is sensitive to both Alzheimer's like pathological accumulation and normal ageing processes in mice. *Behav Brain Res* **254**, 73–82 (2013).

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

☐ No

X Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

The animals will be housed individually during the (exercise) intervention because it is necessary to monitor the physical activity of the individual. (e.g. amount burrowed or distance run)

G. Location where the animals procedures are performed

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

X No > Continue with question H.

☐ 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.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

Animals may experience mild pain during the treadmill running test due to the mild electrical shock which is used as a negative reinforcer. This pain cannot be relieved, this would compromise the treadmill endurance test.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Disclaimer: The information provided in section I has been described in the exact same manner as in appendix 3 (copy-paste). This was done because this experiment is exactly the same in terms of set-up and behavioural tests being performed, the only difference is the fact that we use J20 AD-model mice.

Animals may be mildly stressed by the treadmill exercise and by our novel method of induced inactivity. They may be moderately stressed by the treadmill endurance test. During other behavioural tests animals may experience discomfort/novelty stress induced by handling and exposure to test arena's or apparatus. Moreover, animals that are used in the Time-Place learning paradigm will lose weight and

may experience mild stress or discomfort due to the food restriction or falling from the platforms on a soft surface.

Explain why these effects may emerge.

We expect no adverse effects on animal welfare during any of the voluntary exercise interventions, as these interventions are based on enriching the environment of the animal.

With regard to the inactivity methods, we may expect that the housing in a smaller cage or a cage without climbing possibilities will adversely affect the welfare of the animal to some extend as it cannot fully engage in natural forms of locomotor activity.

We expect treadmill running to induce mild stress induced by the shock grid at the end of the treadmill lanes. The treadmill endurance test may exert moderate discomfort because of running until exhaustion combined with the use of shocks.

Animals experience novelty stress when exposed to an unfamiliar environment, this is likely to occur in any of the test arena's we use. In the Morris Water Maze, some additional discomfort arises due to the forced swimming that is part of the maze protocol (mice are not particularly fond of swimming).

Finally, the food deprivation that is used to motivate the mice in the automated time-place learning task will induce adverse effects on the animals welfare due to a reduced caloric intake, weight loss and hunger.

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

The possible adverse welfare effects of the inactivity method cannot be avoided as this is an intrinsic part of the method. However, we will carefully monitor the inactivity groups to ensure they do not exert stereotypical behaviour (already when testing the method as indicated in appendix 1, but also during the experiments described in the current appendix). It is of note that our pilot experiments did not reveal that this temporary increase in inactivity causes abnormal overt behaviour.

The adverse welfare effects due to food restriction and falling during the automated Time-Place learning task cannot be avoided as this is an intrinsic part of the task and a food reward an essential positive reinforcer. We will monitor the weight and food intake of the animals that are being food deprived daily and provide enough food for their bodyweight not to fall below 85% of their original body weight.

A habituation phase is present in all our behavioural tests whenever it is possible, including the Morris Water Maze. This reduces stress due to handling and exposure to the tests.

A habituation phase can assure the animals get used to running in the treadmill at a low pace, reducing stress and discomfort to some extent. We cannot replace the foot shock as it is essential to motivate the animals. (Animals will habituate to and eventually ignore prodding by the researcher, for example.) Careful monitoring of the animals during the treadmill endurance test ensures they are placed back in their home cage as soon as they are exhausted.

J. 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 K.

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

Disclaimer: The information provided in section J has been described in the exact same manner as in appendix 3 (copy-paste). This was done because this experiment is exactly the same in terms of set-up and behavioural tests being performed, the only difference is the fact that we use J20 AD-model mice. Additional information is <u>underlined</u> for your convenience.

An animal will be euthanized if a significant decline in general health status arises, indicated by for example a matt and lustreless fur, or by showing signs of pain. Mice will be euthanized if they lose more than 15% bodyweight, show piloerection or show abnormal behaviour, like a strong decline

feeding/drinking, and reluctance to accept handling. We do not expect the animals to reach such a condition as a consequence of the experiments, but adverse health effects may arise sporadically during the aging process of the mice.

Indicate the likely incidence.

None of these cases are to be expected in the wild-type mice. In the J20 mice we might expect ome morbidity related to the 15% increase in mortality, but the cause of premature death in this line is unknown (so we cannot be certain about increased morbidity).[1]

References:
[1] Cheng, I. H., Scearce-Levie, K., Legleiter, J., Palop, J. J., Gerstein, H., Bien-Ly, N., … Mucke, L. (2007). Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *J Biol Chem*, **282**(**33**), 23818–23828. http://doi.org/10.1074/jbc.M701078200

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

Any of the behavioural tasks apart from the Time-Place learning test, because of novelty stress and the use of a mild shock in the treadmill test: 'Mild'. The automated time-place learning test, because of the food deprivation: 'Mild'

The treadmill endurance tests results in 'Moderate' discomfort due to the use of exhaustion as an endpoint in the test.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

All animals will be killed to collect muscle tissue, fat pads and the hearth, which are needed to confirm the physiological effects of the (in)activity intervention. Brain tissue will be collected to confirm the animals have developed AD pathology (Amyloid plaques).

The animals that undergo experimental set-up 3 (no behavioral testing) need to be killed in order to take out brain tissue for detailed (immuno-histochemical) analyses.

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.

X Yes

9

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer (Intern RuG code **9005**)
2. Titel van het project: **Train the sedentary brain: Move smart to reduce the risk of dementia**
3. Titel van de NTS: **Train het inactieve brein: Slim bewegen om de kans op dementie te verminderen**
4. Type aanvraag:

   - **nieuwe aanvraag projectvergunning**

5. Contactgegevens DEC:
   - naam: DEC-RUG
   - telefoonnummer contactpersoon: [redacted]
   - mailadres contactpersoon: [redacted]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

   - ontvangen door DEC: 08-10-2015
   - aanvraag compleet: 08-10-2015
   - in vergadering besproken: 15-10-2015
   - anderszins behandeld: 13-01-2016, 22-01-2016
   - termijnonderbreking(en) van / tot 19-10-2015 tot 17-12-2015, 13-01-2016 tot 19-01-2016
   - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
   - aanpassing aanvraag: 19-12-2015, 19-01-2016
   - advies aan CCD: 26-01-2016
7. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**
   - Datum
   - Plaats
   - Aantal aanwezige DEC-leden
   - Aanwezige (namens) aanvrager
   - Strekking van de vraag / vragen
   - Strekking van het (de) antwoord(en)

- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag

8. Correspondentie met de aanvrager
   - Datum: 19-10-205, 13-01-2016
   - Strekking van de vraag / vragen:

Opmerkingen t.a.v. de projectbeschrijving

Op pagina 3, bij 3.2. Doel, schrijft u 'five research questions will be answered' . Hierna volgt een lijst met 4 (en niet 5) onderzoeksvragen.

De achtergrondbeschrijving (# 3.1) in het projectvoorstel is een vrij slordig en te lang stuk tekst met veel intrinsieke herhalingen. Het primaire doel van het hele project wordt al vrij snel duidelijk, maar dan volgen een reeks uitspraken/veronderstellingen zonder enige referentie uit de literatuur, inclusief eigen werk. Dit stuk tekst zal het eerste zijn dat door het CCD-bureau gelezen wordt – en dat moet een heldere binnenkomer zijn. Lange zinnen en/of vrij cryptische zinnen kunnen beter vermeden worden.

Voorbeelden hiervan zijn:

' Inactivity is a risk-factor which is independent of exercise engagement with regard to the development of cardiovascular diseases and possibly neurodegenerative diseases.'

'Translational value
Of course it is of importance to ensure results from animal studies are of translational value (to the clinical setting). In order to ensure we can link any causal mechanisms identified in mice to the human situation, this research is performed in a consortium consisting of our research group and three research group performing similar experiments in elderly and dementia patients (Including cohorts of APOE4 carriers in both groups).'

In aanvulling op hierboven, de vervolginformatie dat het project deel uitmaakt van een consortium is uiterst relevant om de geloofwaardigheid van het projectvoorstel te onderbouwen, maar nadere informatie wordt niet gegeven. Bij 'Vragen t.a.v. de projectbeschrijving' (zie hieronder) wordt u hierover ook een vraag gesteld.
Een ander voorbeeld is: Bij 'Achievability' schrijft u: 'We do not anticipate any technical difficulties as our research group is quite experienced in performing behavioural studies and exercise interventions in rodents. We've recently developed novel strength exercise models and a novel inactivity model in mice. Combined with existing (exercise) models in mice, such as voluntary running in a running wheel or housing in an enriched environment, these models will allow us to test for independent and synergistic effects of inactivity, endurance exercise, strength exercise and cognitive stimulation in mice'

Als deze zin met de kritische/sceptische blik van een beoordelende instantie zou worden bekeken dan staat hier: - dat we geen technische problemen verwachten - want we zijn heel ervaren - en we hebben net krachttraining-modellen en een inactiviteitsmodel opgezet, en samen met wat we al hebben, zoals loopwielen en kooiverrijking, maken deze modellen het mogelijk 'to test for independent and synergistic effects of inactivity, endurance exercise, strength exercise and cognitive stimulation in mice.'
Er is overtuigender argumentatie voorstelbaar. Overigens, synergisme betekent: 'meer dan de som der delen'; mogelijk zou een additief effect al heel mooi zou zijn.
Voor bovenstaand deel kan gesteld worden dat de marketing van de eigen expertise en

wetenschappelijke positie (referenties!) een flink stuk beter kan. Ook onder # 3.3 (Belang) worden een aantal uitspraken gedaan die smeken om referenties – en tevens om een compactere tekst.
Rubriek # 3.4 (Onderzoeksstrategie) begint met de zin:
'Before we perform the experiments designed to meet the objectives specified in part 3.2 we need to meet the following prerequisites:
1. A working model for strength exercise in aged mice and AD model mice.
2. A working model of inactivity in aged mice and AD model mice.
3. A working cognitive test battery, including an episodic memory test to test higher cognitive functions, which can be performed successfully by aged mice.'
en dan volgt: 'We are currently comparing a number of strength and inactivity models in order to select the most effective models, these studies are performed in healthy young male mice. Similarly, our automated Time-Place learning test has been applied in healthy young male mice. This test needs further optimization though'.

Bij bovenstaande is het duidelijk wat er aan modellen nodig is maar wat er al loopt blijft onduidelijk. In de lange tekst die volgt komt herhaaldelijk naar voren dat iets nog opgezet of ontwikkeld of geoptimaliseerd wordt of moet worden.

Vragen t.a.v. de projectbeschrijving

Vraag 1: U noemt dat het werk deel uitmaakt van een consortium waarin ook klinische studies bij ouderen en demente patiënten plaatsvinden. Kunt u de relatie/translatie van het dierexperimentele werk met het (mogelijk) onderzoek bij de mens beter beschrijven?

Vraag 2: De mogelijkheid bestaat dat overmatige activiteit (b.v. door aanbieden van loopwiel) leidt tot verslaving, hetgeen een invloed kan hebben op de te bestuderen parameters. Hoe ziet u dit?

Opmerkingen t.a.v. de bijlagen
Appendix 1 (Optimization of mouse models of strength exercise and physical inactivity) (suggestie: laat optimization eruit) bevat verschillende paragrafen die duidelijk en concreet zijn maar te vaak wordt aangegeven dat er nog van alles op bruikbaarheid uitgetest of geoptimaliseerd moet worden. Een berekening of validatie van aantallen dieren is nagenoeg afwezig.
Appendix 2 (Optimization of episodic memory tests in mice). Dit moet korter, minder voorwaardelijk (if these tests are successful (2x), minder verbrokkeld (de WWWW-test wordt 2x uitgelegd, de eerste keer met het accent op potentiële problemen) – Positief is hier het gebruik van referenties (globaal aangegeven). Aantallen dieren zijn wederom niet gevalideerd.
Appendix 3 (Effects of endurance exercise, strength exercise, combination therapy and physical inactivity in young and aged mice) (suggestie: laat combination therapy eruit, vraagt om misverstanden). Opmerkelijk is hier: copy-paste van drie tekstblokken uit appendices 1 en 2, en dat kan natuurlijk niet. De technische beschrijving van nog niet eerder ge-expliciteerde modellen lezen vrij goed weg, maar allerlei uitspraken vragen om referenties.
Dieraantallen worden genoemd maar niet gevalideerd.
Appendix 4 (Effects of endurance exercise, strength exercise, combination therapy and physical inactivity in J20 Alzheimer mice) is nagenoeg geheel copy-paste van appendix 3. Overigens wordt hier voor het eerst de J20 Alzheimer muis genoemd, helaas zonder enige (korte) beschrijving van de eigenschappen (literatuur!). Dieraantallen genoemd, verder niet.
Appendix 5 (Effects of endurance exercise, strength exercise, combination therapy and physical inactivity in hAPOE4 mice). Voor 99% copy-paste van appendix 4. Dieraantallen niet gevalideerd.

Vervolgvragen

De algemene project-tekst is verbeterd, is helderder en is inclusief referenties. Wat nog steeds mist is de link met het parallelle humane onderzoek. Dit staat wel in de respons op de vragen maar niet of nauwelijks (expliciet) benoemd in de tekst.

Het bevat een go/no go strategie (test ontwikkelen en dan testen in doelgroep dieren). Het is echter niet duidelijk hoe groot u de kans inschat dat de eerste stap lukt en dat de tweede dan zo groot kan worden ingezet. Verder staan in 1 en 2 al oude en AD dieren genoemd; dit is niet helder in de rest van de tekst. De tekst suggereert dat dit alleen in 3,4,5 gebeurt.

De aantallen dieren staan nog wat ruim de NTS: 3000-4000 is nogal een marge.
De opgegeven aantallen in de appendices lijken wel goed onderbouwd door power berekeningen. De marge in de totale aantallen in de NTS zou mogelijk kunnen voortvloeien uit de ruimte die u als aanvrager neemt om een extra controle groep in te zetten in het merendeel van de experimenten. Het Zou ook kunnen komen doordat in de eerste appendices de mogelijkheid wordt genoemd dat het experiment in tweevoud gedaan moet worden. Mogelijk kan de tekst in de NTS nog aangepast/verduidelijkt worden op het punt van de totale aantallen.

- Datum antwoord: 17-12-2015, 19-01-2016
- Strekking van het (de) antwoord(en): **De gevraagde verduidelijkingen zijn verwerkt in het projectvoorstel en de bijlages. De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.**

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
   - Aard expertise
   - Deskundigheid expert
   - Datum verzoek
   - Strekking van het verzoek
   - Datum expert advies
   - Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag
3. De DEC is competent om hierover te adviseren
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering **NVT**

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

   - ☐ **X uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord**

- uit onderwijskundig oogpunt verantwoord
- uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord
- wettelijk vereist

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en) **JA, deze zijn juist aangekruist.**
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als **substantieel**
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project **JA, met de gevolgde strategie en aanpak zullen de doelstellingen van het project behaald kunnen worden.**
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd **NVT**
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd **JA, de inschatting is realistisch en goed geclassificeerd.**
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen, want inspanning wordt gebruikt als manier om veroudering/dementia tegen te gaan/te beinvloeden. Dit is gekoppeld aan het aanpalende humane onderzoek. Dit kan niet anders dan in levende dieren. Verder wordt gedrag (cognitieve vaardigheden) gebruikt als uitleesparameter voor de behandelingen. Dit kan wederom niet anders dan in levende dieren.**
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt **JA, de onderzoekers hebben een go/no go moment ingebouwd om te voorkomen dat er onnodig veel dieren worden gebruikt in het experiment. Verder is de statistische onderbouwing van de aantallen adequaat. De onderzoeksgroep bevat de nodige expertise. Een sterk punt van het project is de koppeling met parallel lopend onderzoek bij mensen.**
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van

dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten **JA, de onderzoekers hebben het onderzoek zodanig opgezet dat het project in overeenstemming is met de vereisten van verfijning. Bijvoorbeeld in Bijlage 1 geven de onderzoekers aan dat waar dat mogelijk is voor de inspanningstesten geen geforceerde methoden worden gebruikt ('voluntary'), dat dieren worden gehabitueerd aan opstellingen om (onnodige) stress te voorkomen, en dat de shock intensiteit bij de 'treadmill test' zo laag mogelijk is voor het beoogde doel.**

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd **JA, het is voor iedereen een goed leesbare tekst.**

D. Ethische afweging

Dementie, in het bijzonder de ziekte van Alzheimer, is een ernstige neurocognitieve (verouderings)aandoening, die de kwaliteit van het leven (zeer) negatief beinvloedt. Onderzoek bij mens en dier, dat de kans kan verlagen of de impact kan verminderen, is daarom van groot maatschappelijk/gezondheidsbelang. Dit dierexperimentele onderzoek is gericht op de rol van verschillende vormen van beweging(sport) in het voorkomen van/beïnvloeden van dementie, zoals de ziekte van Alzheimer. Het onderzoek is gekoppeld aan en ingebed in een groter humaan-georienteerd onderzoeksproject gericht op dementie. Het heeft daarom een grote kans succesvol te zijn omdat directe afstemming en uitwisseling met aanpalend humaan onderzoek mogelijk is. Verder hebben de onderzoekers een go/no go moment ingebouwd om te voorkomen dat zonder degelijke onderbouwing verdere experimenten worden gedaan. Het matige ongerief dat de dieren wordt aangedaan wordt in de visie van de DEC moreel gerechtvaardigd vanwege het maatschappelijk/gezondheidsbelang en de verwachte resultaten. Deze rechtvaardiging vindt verder zijn grond in de zorgvuldige methodische en stapsgewijze benadering van het project.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

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

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op **consensus**

10

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen
[redacted]
A. Deusinglaan 1 [redacted]
9713 AV GRONINGEN

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD105002016405

Bijlagen
2

Datum 26 januari 2016
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],
Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 26 januari 2016.
Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002016405. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project
Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur
Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie
Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	10500
Naam instelling of organisatie:	Rijksuniversiteit Groningen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
KvK-nummer:	1179037
Straat en huisnummer:	A. Deusinglaan 1 [redacted]
Postcode en plaats:	9713 AV GRONINGEN

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Afdeling:	[redacted]
Telefoonnummer:	[redacted]
E-mailadres:	[redacted]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam:	[redacted]
Functie:	PhD student
Afdeling:	[redacted]
Telefoonnummer:	[redacted]
E-mailadres:	[redacted]

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?	[x] Nieuwe aanvraag [ ] Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn [ ] Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum:	1 december 2015
Geplande einddatum:	1 december 2020
Titel project:	Train the sedentary brain: Move smart to reduce the risk of dementia
Titel niet-technische samenvatting:	Train het inactieve brein: Slim bewegen om de kans op dementie te verminderen
Naam DEC:	DEC-RUG
Postadres DEC:	A. Deusinglaan 1, [redacted]
E-mailadres DEC:	secrdec.umcg@umcg.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen:	€ 1727,-
De leges voldoet u:	na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:	[x] Projectvoorstel [x] Beschrijving Dierproeven [x] Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen:	[x] DEC-advies

Ondertekening

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Plaats:	Groningen

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen
[redacted]
A. Deusinglaan 1 [redacted]
9713 AV GRONINGEN

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD105002016405

Bijlagen
2

Datum 26 januari 2016
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 26 januari 2016
Vervaldatum: 25 februari 2016
Factuurnummer: 16700405

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD105002016405	€ 1727,-

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

12

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen
[redacted]
A. Deusinglaan [redacted]
9713 AV GRONINGEN

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD105002016405
Bijlagen
1

Datum 25 FEB. 2016
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 26 januari 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Train the sedentary brain: Move smart to reduce the risk of dementia" met aanvraagnummer AVD105002016405. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing
Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de algemene voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.
U kunt met uw project "Train the sedentary brain: Move smart to reduce the risk of dementia" starten. De vergunning wordt afgegeven van 25 februari 2016 tot en met 1 december 2020. De looptijd van de vergunning wijkt af omdat de startdatum in de aanvraag in het verleden ligt.
Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 26 januari 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.
Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen het advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Met het oog op art. 10a, lid 1, worden twee algemene voorwaarden toegevoegd. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

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 20401, 2500 EK 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. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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

Meer informatie
Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:
[redacted]
ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:
- Niet technische samenvatting
- Vergunning
  Hiervan deel uitmakend:
  - DEC-advies
  - Weergave wet- en regelgeving

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:	Rijksuniversiteit Groningen
Adres:	A. Deusinglaan 1 HPC: FA29
Postcode en plaats:	9713 AV GRONINGEN
Deelnemersnummer:	10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 25 februari 2016 tot en met 1 december 2020, voor het project "Train the sedentary brain: Move smart to reduce the risk of dementia" met aanvraagnummer AVD105002016405, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [redacted]
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 26 januari 2016
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 januari 2016;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 januari 2016;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 26 januari 2016, ontvangen op 26 januari 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Testing of strength exercise methods and physical inactivity methods in mice.	Muizen (Mus musculus) / C57BL/6; J20 (Alzheimer's Ziekte model); volwassen en oudere dieren; beide geslachten	392	Matig / moderate	
Testing of episodic memory tasks in mice	Muizen (Mus musculus) / Gelijk aan dierproef 1.	146	Licht / mild	De dieren worden individueel gehuisvest.
Effects of endurance exercise, strength exercise, physical inactivity and cognitive stimulation in adult and aged mice.	Muizen (Mus musculus) / C57BL/6; volwassen en oudere dieren; beide geslachten	1096	Matig / moderate	De dieren worden individueel gehuisvest.
Effects of endurance exercise, strength exercise, physical inactivity and cognitive stimulation in hAPOE4 mice.	Muizen (Mus musculus) / hAPOEe4 en hAPOEe3; oudere dieren; vrouwelijk	1156	Matig / moderate	De dieren worden individueel gehuisvest.
Effects of endurance exercise, strength exercise, physical inactivity and cognitive stimulation in Amyloid Alzheimer's Disease model mice.	Muizen (Mus musculus) / J20; C57BL/6; volwassen dieren; beide geslachten	1120	Matig / moderate	De dieren worden individueel gehuisvest.

Voorwaarden
Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen
De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat de go/no go momenten worden afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is 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. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

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. Uit artikel 10b 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 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.
Artikel 10b schrijft 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 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 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 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 13d 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 13c 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.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

[redacted]

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 25 februari 2016 14:01
Aan: [redacted]
Onderwerp: terugkoppeling besluit aanvraag AVD105002016405

Geachte leden van DEC-RUG,

Op 26 januari 2016 heeft u advies uitgebracht op de projectaanvraag met titel 'Train the sedentary brain: Move smart to reduce the risk of dementia', en aanvraagnummer AVD105002016405. Wij danken u voor uw advies en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug. De CCD heeft besloten de vergunning te verlenen, onder de volgende algemene voorwaarden:

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat de go/no go momenten worden afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is 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. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

De aanvrager en de verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

We hopen u op deze wijze voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven **www.centralecommissiedierproeven.nl**
.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl