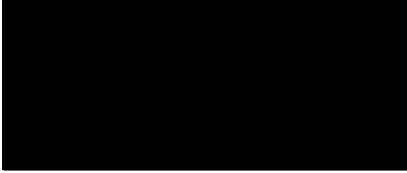




Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproe
ven.nl

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

Onze referentie
B.2.16.029


Uw referentie

Briefkenmerk
CCD-2017-129

Bijlage(n)
2

Datum **04 MEI 2017**
Betreft Beslissing op bezwaar B.2.16.029 (W16-12S)

Geachte heer 

Bij brief van 31 oktober 2016, ontvangen op 1 november 2016, heeft u, namens uw cliënte mevrouw , een bezwaarschrift (met kenmerk 2016/179) ingediend tegen het besluit van de Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) van 22 september 2016 met kenmerk W16-12S.

Verloop van de procedure

Op 25 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 zevental verschillende vergunningen. Voor een opsomming van de vergunningen wordt verwezen naar het verzoek. Bij besluit van 22 september 2016 is op dit Wob-verzoek beslist.

Middels de reactie van 1 november 2016 op uw klachtbrief van 1 november 2016 is aangegeven dat de documenten op korte termijn op de website van de CCD zouden worden geplaatst. Dit is aldus op 14 november 2016 geschied.

Op 2 november 2016 hebben wij per brief bevestigd dat wij uw bezwaarschrift hebben ontvangen.

Op 14 november 2016 hebben wij uw cliënte per e-mail medegedeeld dat de documenten van Wob-besluit W16-12S op de website van de CCD staan gepubliceerd.

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 W16-12S sinds 14 november 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.

Op 3 april 2017 heeft de telefonische hoorzitting met een van de derde belanghebbenden plaatsgevonden. Op verzoek van deze vergunninghouder is, mede vanwege het bespreken van vertrouwelijke, concurrentiegevoelige, gegevens, afzonderlijk gehoord. De partijen zijn geïnformeerd over het verhandelde tijdens het horen buiten hun aanwezigheid. Het verslag van de hoorzitting met de derde belanghebbende is als bijlage bij dit besluit gevoegd.

Voorts heeft op 4 april 2017 de hoorzitting met u plaatsgevonden. Het verslag van de hoorzitting is eveneens 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 handelwijze 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.

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

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 22 september 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 wegeringen 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**).

Voor wat betreft 2015358 is niet inzichtelijk gemaakt of de zienswijze van de belanghebbende wordt gevolgd en het deelnemernummer wordt geweigerd. Het weigeren van dit nummer zou onterecht zijn (hierna: **bezwaar 5**). Ook is naar uw mening niet inzichtelijk gemaakt of de zienswijze bij 2015352 is gevolgd met betrekking tot onderzoeksstrategieën en literatuurverwijzingen. Dat de informatie niet meer wordt beschermd door intellectueel eigendom is onterecht en dat het ongepubliceerde stukken betreft, is geen grond voor weigering (hierna: **bezwaar 6**). Voorts heeft u aangegeven dat niet inzichtelijk is gemaakt of de zienswijze van de belanghebbende bij 2015358 is gevolgd met betrekking tot het productieproces, de productiestrategie, de commerciële toepassing en de afzet van producten. Bestreden wordt dat openbaarmaking leidt tot onevenredige benadeling (hierna: **bezwaar 7**).

Tijdens de hoorzitting heeft u aanvullend aangegeven dat tegen de vergunningen 2015355, 2015356 en 2015357 geen bezwaar bestaat. In vergunning 2015352 is een deel van de onderzoeksopzet en de mate van ongerief geweigerd. Dat sprake is van een subsidieverlening kan niet worden geweigerd op grond van artikel 10 lid 1 sub c van de Wob. Daarnaast kan niet in de subsidievoorwaarden staan dat de subsidie wordt ingetrokken bij vroegtijdige openbaarmaking van de informatie, omdat dit in strijd is met de wet. In de vergunningen 2015358, 2015359 en 2016403 zijn ten onrechte delen van de onderzoeksopzet geweigerd. In 2015358 zijn aantallen proefdieren geweigerd, bijvoorbeeld onder punt B van de aanvraag. Deze gronden zullen onder **bezwaar 3, 6 en 7** 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. 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 door de CCD wordt hierop niet beslist.

Tijdens de hoorzitting heeft u voorts aangegeven dat tegen de vergunningen 2015355, 2015356 en 2015357 geen bezwaar bestaat. In vergunning 2015352 zijn volgens u ten onrechte een deel van de onderzoeksopzet en de mate van ongerief geweigerd. Nu in deze vergunning sprake is van een universiteit, kan geen sprake zijn van informatie die vertrouwelijk aan de overheid is verstrekt. Voorts kan subsidieverlening niet worden geweigerd op grond van artikel 10 lid 1 sub c van de Wob en kan naar uw mening niet in de subsidievoorwaarden staan dat de subsidie wordt ingetrokken bij voortijdige openbaarmaking van de informatie. U heeft aangegeven dat in de vergunningen 2015358, 2015359 en 2016403 ten onrechte delen van de onderzoeksopzet zijn geweigerd. In vergunning 2015358 zijn daarnaast ten onrechte dieraantallen zijn geweigerd.

Hierna wordt per vergunning – indien informatie is geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob en het geen namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen betreft of indien hierover twijfel bestaat – het oordeel van de CCD weergegeven over het weigeren van de betreffende informatie.

Voor wat betreft vergunning 2015352 zal het oordeel van de CCD worden weergegeven onder 'bezwaar 6'.

De CCD is van oordeel dat voor wat betreft de vergunningen 2015355, 2015356 en 2015357 wellicht niet geheel duidelijk is of informatie is geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob. In de bijbehorende inventarissen is 'sub g' niet aangekruist en in het bestreden besluit zijn de zienswijzen van de vergunninghouders op het punt van 'herleidbaarheid' weliswaar opgenomen, maar ontbreekt het oordeel van de CCD. In de betreffende documenten zijn slechts namen, specifieke locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn naar natuurlijke personen en handtekeningen geweigerd. De CCD is van oordeel dat deze gegevens terecht niet zijn geopenbaard vanwege het belang van het beschermen van de persoonlijke levenssfeer en het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling. Dit volgt uit zowel de gronden opgenomen in het bestreden besluit (voor wat betreft de eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer) als uit de gronden die elders in dit besluit zijn opgenomen.

De bijbehorende inventarissen zullen voor de volledigheid worden aangepast, in die zin dat ook 'sub g' zal worden aangekruist. In deze vergunningen is geen informatie vanwege concurrentiegevoeligheid geweigerd.

Voor wat betreft vergunning 2015358 zal het oordeel van de CCD worden weergegeven onder 'bezwaar 5' en 'bezwaar 7'.

Voor vergunning 2015359 geldt net als voor de vergunningen 2015355, 2015356 en 2015357 dat wellicht niet geheel duidelijk is of informatie is geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob. In de bijbehorende inventaris is 'sub g' niet aangekruist en in het bestreden besluit zijn de zienswijzen van de vergunninghouder en de DEC weliswaar opgenomen, maar ontbreekt het oordeel van de CCD.

Tijdens de hoorzitting heeft u aangegeven dat in deze vergunning ten onrechte een deel van de onderzoeksopzet is geweigerd. De geweigerde delen in deze vergunning betreffen echter allen namen, specifieke locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen. Naast de documenten waar het op voorhand duidelijk is dat het om deze gegevens gaat, blijkt dat het pagina 8, 9, 10, 14, 16, 18, 23, 25, 30, 39, 64 en 65 van het geheel in alle gevallen gaat om persoonsnamen en specifiek om namen van onderzoekers die ook bij dit onderzoek zijn betrokken. Dit blijkt tevens uit de context van de (voorafgaande) tekst. De CCD is van oordeel dat deze gegevens in het bestreden besluit terecht zijn geweigerd op grond van de eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer en middels dit besluit ook op grond van het voorkomen van onevenredige benadeling dienen te worden geweigerd. Delen van de onderzoeksopzet zijn niet geweigerd.

Blijkens de bijbehorende inventaris is voor wat betreft vergunning 2016403 in de documenten 2, 4 en 7 informatie geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob. Het gaat om zowel namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot personen en handtekeningen als referenties en inhoudelijke informatie. Uit het bestreden besluit volgt dat een deel van de zienswijzen van de vergunninghouder en de DEC is opgenomen, maar dat het oordeel van de CCD hierover ontbreekt.

Voor wat betreft namen, specifieke locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen is de CCD van oordeel dat deze in het bestreden besluit terecht zijn geweigerd op grond van de eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer en middels dit besluit ook op grond van het voorkomen van onevenredige benadeling. Dit geldt ook voor deze gegevens in de documenten 1, 8, 9, 11, 12 en 13. In de inventaris is bij deze documenten 'sub g' niet aangekruist, maar dat zal middels dit besluit alsnog gebeuren.

Abusievelijk is de zienswijze van de vergunninghouder voor wat betreft deze weigeringsgrond ook voor een deel niet opgenomen in het besluit. De vergunninghouder heeft aangegeven dat een aantal referenties niet geopenbaard mag worden, omdat het referenties naar de eigen onderzoekers betreft. Om dezelfde reden mogen ook enkele tekstdelen niet worden geopenbaard, omdat deze stukken over eerder, vergelijkbaar onderzoek van de betreffende onderzoeksgroep gaan. Voorts mag een specifieke term en daaraan gerelateerde informatie niet geopenbaard worden, omdat deze term kenmerkend is voor de betreffende onderzoeksgroep en door middel van een eenvoudige zoekopdracht naar deze onderzoeksgroep leidt. Dit geldt tenslotte ook voor de naam waar deze onderzoeksgroep een samenwerkingsverband mee heeft.



De CCD is van oordeel dat referenties die naar onderzoekers leiden die ook betrokken zijn bij het huidige onderzoek geweigerd dienen te worden. Uit navraag is gebleken dat het om referenties naar de verantwoordelijk onderzoeker en twee samenwerkende collega's gaat. In document 2 zijn derhalve 3 referenties geweigerd. Daarnaast blijkt dat in document 2 een enkele keer is verwezen naar eerder onderzoek van de betrokken onderzoeker. Wanneer deze zinsdelen worden geopenbaard, leidt dit eenvoudig tot de betrokken onderzoekers. Middels dit besluit zal worden verduidelijkt welke zinnen naar eerder onderzoek leiden.

Aangaande de specifieke term en afgeleiden daarvan is de CCD van oordeel dat deze term inderdaad eenvoudig tot de betreffende onderzoeksgroep kan leiden, bijvoorbeeld via de website van de samenwerkende groep of een eenvoudige zoekopdracht op internet. Het feit dat deze informatie al in een andere vorm is gepubliceerd brengt niet zonder meer mee dat gegevens in een Wob-procedure niet meer kunnen worden geweigerd. Met name de context waarbinnen de informatie wordt geopenbaard is van belang. Bovendien omvat de onderzoeksopzet meer (specifieke) informatie over het onderzoek dan hetgeen op een website is gepubliceerd.

De naam van de instantie waarmee door de vergunninghouder wordt samengewerkt wordt geweigerd. Aanvullend aan het bestreden besluit stelt de CCD dat de Raad van State geen aanleiding heeft gezien om namen openbaar te maken, waarmee een vergunninghouder in een bepaald onderzoek samenwerkt. Verwezen wordt naar de uitspraak van de Raad van State van 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952).

Op basis van het vorenstaande 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 dierenrechtenactivisme¹. 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 mogelijk 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 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.

Het belang van weigering van persoonsgegevens en tot persoonsgegevens herleidbare informatie weegt op grond van eerbiediging van de persoonlijke

¹ Biz. 14 Memorie van Toelichting Wet op de dierproeven



levenssfeer zwaarder dan het publiek belang van openbaar maken van deze informatie.

Op basis van het vorenstaande slaagt deze grond niet.

Ten aanzien van bezwaar 5

U heeft in uw bezwaarschrift aangegeven dat niet inzichtelijk is of de zienswijze van de derde belanghebbende bij vergunning 2015358 is gevolgd met betrekking tot het weigeren van het deelnemernummer. Weigering van het deelnemernummer is onterecht, omdat het niet leidt tot identificatie van individuele, natuurlijke personen.

Uit het kopje 'eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer' in het bestreden besluit blijkt dat de vergunninghouder bij vergunning 2015358 heeft verzocht om – onder andere – het niet openbaren van het deelnemernummer. De CCD erkent dat hierdoor verwarring kan ontstaan over het wel of niet openbaren van het deelnemernummer van de betrokken vergunninghouder. Het deelnemernummer is middels het bestreden besluit echter niet geweigerd. Dit volgt tevens uit de stukken, welke op de website van de CCD reeds zijn geopenbaard.

Op basis van het vorenstaande slaagt deze grond niet.

Ten aanzien van bezwaar 6

Uit uw bezwaarschrift volgt voorts dat niet duidelijk wordt of de zienswijze van de derde belanghebbende bij vergunning 2015352 voor wat betreft onderzoeksstrategieën en literatuurverwijzingen wordt gevolgd. Het feit dat informatie niet meer beschermd zou worden door intellectueel eigendomsrecht is volgens u onjuist en het feit dat het ongepubliceerde informatie betreft, is geen grond om verwijzingen naar die stukken te weigeren. Er is volgens u geen sprake van onevenredige benadeling. Daarnaast heeft u tijdens de hoorzitting aangegeven dat ten onrechte een deel van de onderzoeksopzet en de mate van ongerief zijn geweigerd.

De CCD is met u van mening dat referenties naar onderzoekers die ook bij het onderhavige onderzoek zijn betrokken, dienen te worden geweigerd. In document 2 wordt een tweetal referenties geweigerd en uit navraag bij de vergunninghouder is gebleken dat het referenties van onderzoekers betreft die ook bij dit onderzoek zijn betrokken.

De CCD is van oordeel dat wanneer patent is aangevraagd, dit niet per definitie het gehele onderzoek omvat. De context van de aanvraag met alle achterliggende informatie, waaronder de onderzoeksopzet, omvat meer informatie dan hetgeen waar patent op rust. In het onderhavige geval is bescherming van de onderzoeksstrategie middels intellectueel eigendomsrecht nog niet mogelijk, nu het onderzoek zich nog in de beginfase bevindt. De CCD is met vergunninghouder van oordeel dat nu het onderzoek nog grotendeels moet worden uitgevoerd, het niet wenselijk is dat onder andere de strategie van de komende tijd al in deze fase wordt geopenbaard. Onderdelen worden nog getest en pas na de dierproeven worden resultaten duidelijk en dus ook of bescherming middels intellectueel eigendomsrecht mogelijk is. Wanneer de informatie reeds nu wordt geopenbaard,

is verder onderzoek niet meer van belang. De CCD is van oordeel dat deze informatie terecht is geweigerd.

U heeft aangegeven dat de mate van ongerief is geweigerd. Uit document 5 onder "I" volgt dat niet de mate van ongerief is geweigerd, maar de omstandigheden waaronder bepaalde proeven worden uitgevoerd. Deze omstandigheden zijn kenmerkend voor dit onderzoek en zijn interessant voor concurrenten om soortgelijk onderzoek na te bootsen. Mede op basis van hetgeen hiervoor is aangegeven, zijn deze gegevens terecht geweigerd.

Op basis van het voorgaande slaagt deze grond gedeeltelijk.

Ten aanzien van bezwaar 7

Tenslotte heeft u in uw bezwaarschrift aangegeven dat niet inzichtelijk is gemaakt of de zienswijze van de derde belanghebbende bij vergunning 2015358 is gevolgd voor wat betreft het productieproces, de productiestrategie, de commerciële toepassing en de afzet van producten. Naar uw mening leidt openbaarmaking van deze informatie niet tot onevenredige benadeling. Tijdens de hoorzitting heeft u aangegeven dat dieraantallen ten onrechte zijn geweigerd.

De CCD is met u van oordeel dat niet volledig inzichtelijk is gemaakt of de zienswijze van de derde belanghebbende op dit onderdeel is gevolgd of niet. In het kopje 'bedrijfs- en fabricagegegevens' van het bestreden besluit is aangegeven dat uit de zienswijze onvoldoende is gebleken dat daadwerkelijk sprake is van bedrijfs- en fabricagegegevens, maar dat de motivering die is gegeven, aansluit bij de weigeringsgrond 'het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling'. Hieruit blijkt impliciet dat de CCD de zienswijze van de derde belanghebbende op dit onderdeel heeft gevolgd.

Het productieproces, de productiestrategie, de commerciële toepassing van de onderzoeksresultaten en de afzet van producten kunnen worden beschouwd als bedrijfsvertrouwelijke en concurrentiegevoelige informatie. De derde belanghebbende heeft in de documenten aangegeven welke informatie het specifiek betreft. Dit heeft ertoe geleid dat inhoudelijk slechts een beperkt aantal gegevens door de CCD is geweigerd.

De vergunninghouder heeft middels de zienswijze aangegeven dat met openbaarmaking van de hiervoor genoemde gegevens concurrenten van de klant van vergunninghouder inzicht verkrijgen in deze gegevens, waardoor de concurrentiepositie van de klant van vergunninghouder wordt aangetast. Concurrenten krijgen op die manier op eenvoudige wijze en zonder investeringen inzicht in bedrijfsvertrouwelijke en concurrentiegevoelige informatie. Een bedreiging van de concurrentiepositie van de klant van vergunninghouder levert voorts financiële schade op.

De CCD is van oordeel dat de vergunninghouder en haar klant voldoende inzichtelijk hebben gemaakt dat de geweigerde informatie concurrentiegevoelige informatie betreft. Wanneer concurrenten inzicht krijgen in specifiek deze gegevens, zal het onderzoek eenvoudig te kopiëren zijn dan wel kan soortgelijk onderzoek worden verricht. Met name in het buitenland beschikt men over de capaciteit en de middelen om dergelijk onderzoek na te bootsen.



In de documenten wordt bovendien een specifieke term geweigerd, die kenmerkend is voor de onderzoeksgroep en derhalve direct leidt tot de betrokken onderzoekers. Ook wordt verschillende malen de naam van een samenwerkingsverband geweigerd, vanwege de herleidbaarheid naar de betrokken onderzoekers. Voor een nadere onderbouwing aangaande herleidbaarheid wordt verwezen naar bezwaargrond 3.

Tijdens de hoorzitting heeft u aangegeven dat ten onrechte dieraantallen in deze vergunning zijn geweigerd. Wij hebben geconstateerd dat slechts subaantallen zijn geweigerd en dat de totaalaantallen openbaar zijn. Wij zijn van oordeel dat in het onderhavige geval subaantallen terecht zijn geweigerd, omdat uit de gekozen aantallen de gevolgde lijn van de onderzoeker blijkt. Het gebruikte aantal dieren per groep kan essentieel zijn voor het verdere verloop en de uitkomsten van het onderzoek. Aantallen dieren, aantallen groepen en overlevingstijd betreffen bewuste keuzes van de onderzoekers, welke kenmerkend kunnen zijn voor het onderzoek en daarmee interessant voor concurrenten. Niet slechts concurrenten in Nederland, maar met name internationale concurrenten beschikken over de capaciteit en middelen om eenzelfde onderzoek te verrichten.

Het productieproces, de productiestrategie en gebruikte aantallen dieren per groep maken onderdeel uit van de onderzoeksopzet en deze informatie is in hoge mate concurrentiegevoelig, omdat concurrenten de informatie kunnen gebruiken voor een eigen onderzoeksstrategie in een identieke of vergelijkbare situatie. Hierbij kan verwezen worden naar de uitspraak van de rechtbank Noord-Nederland van 16 oktober 2015 (ECLI:NL:RBNNE:2015:4811), waaruit volgt dat de beoogde onderzoeksopzet terecht is aangemerkt als concurrentiegevoelige en als gevolg daarvan is geweigerd op grond van het voorkomen van onevenredige benadeling. Middels dit besluit zal de genoemde informatie niet worden geopenbaard.

Op basis van het voorgaande slaagt deze grond.

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 verwijst 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,



Prof. dr. L. Hellebrekers
Voorzitter

Inventaris Wob-verzoek W16-12S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015352								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x			x	
3	Niet-technische samenvatting	x		x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x			x	
6	DEC-advies				x			x	
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
9	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
10	Advies CCD		x						x
11	Beschikking en vergunning				x		x	x	
12	Mail beschikking 2-2-2016				x		x	x	
13	Mail terugkoppeling DEC 2-2-2016				x		x	x	

AVD 11500 2015 352

21 DEC 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? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 11500 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="0"><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>UMC Utrecht</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>30244197</td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Instantie voor Dierenwelzijn</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>12007</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>3501 AA Utrecht</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL27INGB0000425267</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Utrecht</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	30244197	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn	Postbus	12007	Postcode en plaats	3501 AA Utrecht	IBAN	NL27INGB0000425267	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht
Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																	
KvK-nummer	30244197																	
Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn																	
Postbus	12007																	
Postcode en plaats	3501 AA Utrecht																	
IBAN	NL27INGB0000425267																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht																	
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>																	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="0"><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]		
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																
Functie	[REDACTED]																	
Afdeling	[REDACTED]																	
Telefoonnummer	[REDACTED]																	
E-mailadres	[REDACTED]																	
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="0"><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres			
(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> 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

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 - 2021

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Molecular Imaging of laboratory animals

- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Moleculaire beeldvorming van proefdieren

- 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 Postbus 85500 3508 GA Utrecht

E-mailadres dec-utrecht@umcutrecht.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
- 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 

Functie 

Plaats *Utrecht*

Datum *15* 

Handtekening 



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.zbo-ccd.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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
 - For routine production, describe what will be produced and for which uses.
 - For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.
-

In both basic science and translational research, imaging techniques are used to visualize and quantify biological processes *in vivo*. Many different research fields are using imaging techniques, for example neurology, oncology, cardiology and orthopaedics, to study diseases and treatment strategies using contrast agents.

In the past, many animals were required to study for instance the biodistribution of a new drug or therapy development. At different time points a group of animals were dissected and the amount of radioactivity in each tissue/organ was measured. As such many animals were required using this approach – different time points and large biological variation - while only 1D (i.e. the total amount of drug inside an organ) or 2D (i.e. distribution of compound within a particular tissue slice) information was obtained. These approaches provide no information on dynamics of compound uptake within the animal, which is of utmost important for development of new therapeutic strategies. Therefore, 3D *in vivo* imaging techniques represent a huge step forward in preclinical research. Using *in vivo* imaging techniques, the animal can be imaged multiple times without being euthanized (Heskamp et al. 2014; Ivashchenko et al. 2015; Vastenhouw et al. 2007) and much more relevant information can be obtained, i.e. the exact location and the amount of the drug at every time-point of the experiment. Also, translational research itself can be performed faster, since the same imaging techniques are used in humans.

Since small laboratory animals are much smaller and physiological processes are usually much faster than in human, dedicated preclinical imaging scanners are developed. Different scanners for different applications like 3D-functional imaging using Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT), Positron Emission Tomography (PET) and Optical Imaging (OI) combined with 3D-anatomical imaging using Computed Tomography (CT) are available. Scanners developed by ██████ are state-of-the-art SPECT/PET/CT/OI scanners which are used world-wide in basic and translational research, see for example (ter Heine et al. 2014; Miest, Frenzke, and Cattaneo 2013; van Dijk et al. 2015; van Oosterom et al. 2014). Today, ██████ equipment is already used in more than 130 peer-reviewed publications.

Based on researcher's feed-back, specific research requests and new technical developments, the SPECT/PET/CT/OI scanners are continuously being improved. These developments include continuous work on improvement of image ██████, detection ██████, ██████ and possibilities of ██████ animal imaging. As an example, better ██████ allows to visualize ██████ in animals *in vivo* (particularly critical in tumour, bone and brain imaging). Higher ██████ allows to detect ██████ receptor densities, perform ██████ imaging (e.g. ██████ of compounds) and increase the total time radiopharmaceutical compound can be followed *in vivo* in one animal. Improvement of these characteristics in our scanners diminish the need for extensive *ex vivo* investigations (i.e. autoradiography and histology) that are currently used as a "gold standard" in multiple areas of translational research, mainly due to their superior resolution. ██████ previous developments already illustrated that high-resolution *in vivo* SPECT can be used

as an alternative for histological studies (Branderhorst et al. 2014) with up to 0.015µL volumetric resolution (Ivashchenko et al. 2014). At the same time, although the performance of [REDACTED] scanners was improved significantly over the last decade (Beekman et al. 2005; van der Have et al. 2009; Goorden et al. 2013; van Oosterom et al. 2014; Ivashchenko et al. 2015), areas of translational research that requires [REDACTED] of imaging devices (e.g. brain receptor mapping) still mainly rely on *ex vivo* imaging instead of *in vivo* investigations due to better [REDACTED] of those techniques. Therefore, further improvement of SPECT/PET/CT/OI scanners in terms of higher [REDACTED] and [REDACTED] can boost *in vivo* research – which is essential in brain research – and could minimize total number of animals required for preclinical research.

In this proposal, advances in imaging equipment and their associated contrast agents are first evaluated and optimized in plastic phantoms. Nevertheless, due to complex longitudinal changes in e.g. radiotracer distribution within the animal, final validation with animal imaging is required. Results of this evaluations and corresponding optimal imaging protocols are usually published in peer-reviewed international journals (among others, Ivashchenko et al. 2015; Ivashchenko et al. 2014; Goorden et al. 2013).

The use of animals for evaluation of new technical developments of the scanners and optimization of imaging protocols is requested in this proposal.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The imaging equipment of [REDACTED] is specifically engineered and developed for state-of-the art small-animal imaging. The scanner can be used for mice, rats and even medium-size animals like rabbits which have their own requirements and optimization.

Based on research developments and feed-back from researchers working with the systems, the system is continuously optimized (i.e. [REDACTED] and [REDACTED]) and new features are added. New parts are developed for the system, first tested and optimized using plastic phantoms and finally evaluated with researchers in animals and published in high-ranked journals. In recent years, we already developed a series of preclinical scanners, provided multiple improvements of these systems and illustrated their beneficial effect on the quality of *in vivo* images and research (Ivashchenko et al. 2015; Ivashchenko et al. 2014; Goorden et al. 2013; Wu et al. 2011; Wu et al. 2014; Beekman et al. 2009; Branderhorst et al. 2014; van der Have et al. 2009; Branderhorst et al. 2012).

This project proposal contains two main research objectives:

1. Imaging of animals [REDACTED]
A continuation of work on development and refinement of preclinical SPECT/PET/CT/OI scanners (e.g improvement of [REDACTED] and [REDACTED]) and associate imaging protocols (e.g. with different hardware, scan parameters, study setup, animal handling or radioligands/contrast agents). The exact technical improvements in [REDACTED] and [REDACTED] planned in the next 5 year cannot be disclosed, however this information is available.
2. [REDACTED] animal imaging
The potential of imaging animals while they [REDACTED] will be evaluated. In contrast to human clinical evaluation, small-animal imaging required

animals [REDACTED] what ultimately effect normal biodistribution of radiopharmaceutical compound in the brain (Shtoyerman et al. 2000; Martin et al. 2006; Tassonyi et al. 2002). In addition, imaging [REDACTED] animals removes the largest [REDACTED] during longitudinal studies, i.e. [REDACTED]. To perform [REDACTED] animals using SPECT/PET you need a [REDACTED] and [REDACTED] system [REDACTED] et al. 2013) with [REDACTED] image resolution. The [REDACTED] SPECT/PET/CT/OI system [REDACTED] (van der Have et al. 2009; Goorden et al. 2013; Ivashchenko et al. 2015). In this specific procedure we are optimizing [REDACTED] animal imaging.

The researchers associated with the animal research are also part of the [REDACTED] development team – which published over 40 papers on the systems [REDACTED] - and are such in close contact with the engineers and researchers designing and implementing new developments.

3.3 Relevance

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

3D imaging techniques are a huge step forward in preclinical imaging. Tiny details of biological processes can be studied and followed over time in a single animal. As such, much more information is obtain from a single study, and translational research can be performed faster since the same imaging techniques are used in humans. Imaging devices described here, i.e. SPECT/PET/CT/OI scanners, can visualize (dynamic) biological processes in animals, information from which can be used to answer different questions of fundamental research. Ultimately, this can be translated into fundamental research in the field of biology, pathology and pharmacology (Miest, Frenzke, and Cattaneo 2013; ter Heine et al. 2014).

Objective 1 (Imaging animals [REDACTED] of this proposal covers continuation of work on development and refinement of preclinical SPECT/PET/CT/OI scanners and associate imaging protocols (e.g. with different hardware, scan parameters, study setup, animal handling or radioligands/contrast agents). These developments include continuous work on improvement of image [REDACTED] and [REDACTED] of scanners.

[REDACTED] plays an essential role in small animal imaging, particularly in research areas that requires sub-cellular level of details (e.g. brain receptors mapping, necrosis and tumour imaging) that is currently beyond capabilities of *in vivo* imaging. Thus, via improvement of spatial [REDACTED] of preclinical scanners, more details about the biological processes are revealed *in vivo* (Branderhorst et al. 2014; Ivashchenko et al. 2014). This ultimately diminishes the need for extensive *ex vivo* investigations with laboratory animals in more and more applications that currently cannot rely on *in vivo* techniques due to their relatively low [REDACTED]. By increasing [REDACTED] of the scanners, [REDACTED] process can be studied *in vivo* (Ivashchenko et al. 2015; Befera, Badea, and Johnson 2014; Hendrikx et al. 2015). At the same time, higher sensitivity increases total time that radiopharmaceutical compounds can be imaged *in vivo* with one animal (e.g. detects [REDACTED] radioactive signals). This, eventually, minimizes the amount of animals that are required for longitudinal studies during development of new therapies and [REDACTED] evaluations. As such, [REDACTED] is continuously improving hardware and software to increase both [REDACTED] and [REDACTED] for further refinement and reduction in animal studies.

Eventually, some technical developments of preclinical imaging techniques can be applied into clinics (e.g. clinical high resolution imaging systems, recently launched [REDACTED] system: [REDACTED]).

In contrast to human clinical evaluation, small-animal imaging requires animals being [REDACTED]. The use of [REDACTED] during SPECT/PET brain imaging of animals can have profound effects on normal cerebral blood flow (Shtoyerman et al. 2000), rates of oxygen metabolism and glucose utilization ([REDACTED] et al. 2006), receptor expression (Tassonyi et al. 2002), and perhaps even receptor occupancy. Thus, SPECT/PET results obtained with [REDACTED] animals may not accurately report the variable of interest and can results in wrong outcomes in translational research. In addition, recovering from the [REDACTED] is

an additional stressor for the animal involved in longitudinal follow-up studies. Being able to scan [REDACTED] animals can have a huge impact on studies like brain research and behavioural studies, resulting in easier translation and more meaningful comparison of results obtained with non-anesthetized rodents and bigger animals or humans. At the same time, this will decrease discomfort and/or stress to animals involved in longitudinal studies. Until recently, preclinical SPECT/PET imaging of [REDACTED] animals wasn't possible. Within objective 2 ([REDACTED] animal imaging) of this proposal we will work on development and optimization of [REDACTED] animal imaging technology.

All imaging protocols developed at [REDACTED] are used to educate new and existing [REDACTED] users, aimed to kick-start their research and as such obtain the best-possible results with fewer animals.

References

- [REDACTED]
- Beekman, Freek J, Brendan Vastenhouw, G. van der Wilt, Marcia Vervloet, R. Visscher, Jan Booij, Mirjam Gerrits, Ruud M Ramakers, and Frans van der Have. 2009. "3-D Rat Brain Phantom for High-Resolution Molecular Imaging." *Proceedings of the IEEE* 97 (12): 1997–2005. doi: 10.1109/JPROC.2009.2028363.
- Befera, Nicholas T, Cristian T Badea, and G Allan Johnson. 2014. "Comparison of 4D-microSPECT and microCT for Murine Cardiac Function." *Molecular Imaging and Biology* 16 (2): 235–45. doi: 10.1007/s11307-013-0686-z.
- Branderhorst, Woutjan, Erwin LA Blezer, Mischa Houtkamp, Ruud M Ramakers, Jeroen H van den Brakel, Henry Witteveen, Frans van der Have, et al. 2014. "Three-Dimensional Histologic Validation of High-Resolution SPECT of Antibody Distributions within Xenografts." *Journal of Nuclear Medicine* 55 (5): 830–37. doi: 10.2967/jnumed.113.125401.
- Branderhorst, Woutjan, Frans van der Have, Brendan Vastenhouw, Max A Viergever, and Freek J Beekman. 2012. "Murine Cardiac Images Obtained with Focusing Pinhole SPECT Are Barely Influenced by Extra-Cardiac Activity." *Physics in Medicine and Biology* 57 (3): 717–32. doi: 10.1088/0031-9155/57/3/717.
- Goorden, Marlies C, Frans van der Have, Rob Kreuger, Ruud M Ramakers, Brendan Vastenhouw, J Peter H Burbach, Jan Booij, Carla F M Molthoff, and Freek J Beekman. 2013. "VECTOR: A Preclinical Imaging System for Simultaneous Submillimeter SPECT and PET." *Journal of Nuclear Medicine* 54 (2): 306–12. doi: 10.2967/jnumed.112.109538.
- Hendriks, Geert, Marijke De Saint-Hubert, Ingrid Dijkgraaf, Matthias Bauwens, Kim Douma, Roel Wierds, Ivo Pooters, et al. 2015. "Molecular Imaging of Angiogenesis after Myocardial Infarction by (111)In-DTPA-cNGR and (99m)Tc-Sestamibi Dual-Isotope Myocardial SPECT." *EJNMMI Research* 5 (January): 2. doi: 10.1186/s13550-015-0081-7.
- Heskamp, Sandra, Otto C Boerman, Janneke DM Molkenboer-Kuening, Rutger HT Koornstra, Sabine C Linn, Wim JG Oyen, Winette TA van der Graaf, and Hanneke WM van Laarhoven. 2014. "Dynamics of IGF-1R Expression during Endocrine Breast Cancer Treatment." *Molecular Imaging and Biology* 16 (4):

529–37. doi:10.1007/s11307-014-0723-6.

Ivashchenko, Oleksandra, Frans van der Have, Marlies Goorden, Ruud Ramakers, and Freek J Beekman. 2015. "Ultra-High-Sensitivity Sub-Mm Mouse SPECT." *Journal of Nuclear Medicine*, February. doi:10.2967/jnumed.114.147140.

Ivashchenko, Oleksandra, Frans van der Have, Jose L Villena, Harald C Groen, Ruud M Ramakers, Harrie H Weinans, and Freek J Beekman. 2014. "Quarter-Millimeter-Resolution Molecular Mouse Imaging with U-SPECT+." *Molecular Imaging* 13 (November): 1–8. doi:10.2310/7290.2014.00053.

Miest, Tanner S, Marie Frenzke, and Roberto Cattaneo. 2013. "Measles Virus Entry through the Signaling Lymphocyte Activation Molecule Governs Efficacy of Mantle Cell Lymphoma Radiovirotherapy." *Molecular Therapy* 21 (11): 2019–31. doi:10.1038/mt.2013.171.

Shtoyerman E, Arieli A, Slovin H, Vanzetta I, Grinvald A. "Long-term optical imaging and spectroscopy reveal mechanisms underlying the intrinsic signal and stability of cortical maps in V1 of behaving monkeys." *J Neurosci* 2000;20:8111–8121.

Tassonyi E, Charpantier E, Muller D, Dumont L, Bertrand D. "The role of nicotinic acetylcholine receptors in the mechanisms of anesthesia." *Brain Res Bull* 2002;57:133–150. doi:10.1016/S0361-9230(01)00740-7.

Ter Heine, Rob, Rogier Lange, Oscar B Breukels, Haiko J Bloemendal, Rob G Rummenie, Antoinette M Wakker, Hilly de Graaf, et al. 2014. "Bench to Bedside Development of GMP Grade Rhenium-188-HEDP, a Radiopharmaceutical for Targeted Treatment of Painful Bone Metastases." *International Journal of Pharmaceutics* 465 (1-2). Elsevier B.V.: 317–24. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.01.034.

Van der Have, Frans, Brendan Vastenhouw, Ruud M Ramakers, Woutjan Branderhorst, Jens O Krah, Changguo Ji, Steven G Staelens, and Freek J Beekman. 2009. "U-SPECT-II: An Ultra-High-Resolution Device for Molecular Small-Animal Imaging." *Journal of Nuclear Medicine* 50 (4): 599–605. doi:10.2967/jnumed.108.056606.

Van Dijk, Laura K, Otto C Boerman, Gerben M Franssen, Johannes Ham Kaanders, and Johan Bussink. 2015. "Cetuximab-F(ab')₂-SPECT and FDG-PET for Prediction and Response Monitoring of Combined Modality Treatment of Human Head and Neck Carcinomas in a Mouse Model." *Journal of Nuclear Medicine* 31 (0). doi:10.2967/jnumed.114.148296.

Van Oosterom, Matthias N, Rob Kreuger, Tessa Buckle, Wendy a Mahn, Anton Bunschoten, Lee Josephson, Fijs Wb van Leeuwen, and Freek J Beekman. 2014. "U-SPECT-BioFluo: An Integrated Radionuclide, Bioluminescence, and Fluorescence Imaging Platform." *EJNMMI Research* 4 (January): 56. doi:10.1186/s13550-014-0056-0.

Vastenhouw, Brendan, Frans van der Have, a J a van der Linden, L von Oerthel, Jan Booij, J Peter H Burbach, Marten P Smidt, and Freek J Beekman. 2007. "Movies of Dopamine Transporter Occupancy with Ultra-High Resolution Focusing Pinhole SPECT." *Molecular Psychiatry* 12 (11): 984–87.

doi: 10.1038/sj.mp.4002028.

Wu, Chao, Johan R de Jong, Hugo A Gratama van Andel, Frans van der Have, Brendan Vastenhouw, Peter Laverman, Otto C Boerman, Rudi AJO Dierckx, and Freek J Beekman. 2011. "Quantitative Multi-Pinhole Small-Animal SPECT: Uniform versus Non-Uniform Chang Attenuation Correction." *Physics in Medicine and Biology* 56 (18): N183–93. doi: 10.1088/0031-9155/56/18/N01.

Wu, Chao, Pieter EB Vaissier, Brendan Vastenhouw, Johan R de Jong, Riemer HJA Slart, and Freek J Beekman. 2014. "Influence of Respiratory Gating, Image Filtering, and Animal Positioning on High-Resolution Electrocardiography-Gated Murine Cardiac Single-Photon Emission Computed Tomography." *Molecular Imaging* 13 (1 mm): 1–11. doi: 10.2310/7290.2014.00052.

3.4 Research strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

Performance evaluation and testing of newly developed systems and imaging protocols can, to some extent, be done with various phantoms (e.g. plastic models). However, number of final tests/experiments will need to be done with live animals.

During typical experiment in this project anesthetized animal receives an injection of a radioligand (SPECT/PET) or a contrast agent (CT/OI). This can be, for example, radiolabeled molecules (radioligand) that are binding to specific biological molecules. After this, the anesthetized animal is imaged in the SPECT/PET/CT/OI scanner. The scanner (in this case SPECT/PET) detects gamma radiation emitted by the molecules and, after multiple calculations, visualizes it as a 3D (three dimensional) biodistribution of the radioligand in the live animal. Multiple image quality characteristics that can be extracted from the image of 3D-biodistribution (e.g. *in vivo* imaging [redacted]) are used to characterise and optimize the performance of the system. The animal used for an imaging experiment is usually euthanized after the end of image acquisition.

For the [redacted] animal scans, first, animals are gradually trained to spend time in a [redacted] that allows for [redacted] inside [redacted] inside the [redacted]. Based on previous results – DEC 2012.I.03.031 – different training options, including rewarding strategies, were evaluated. Based on these results and in consultancy with the IvD, a training scheme will be created to minimize [redacted]. On the day of SPECT/PET scan, the animal is injected with a radioligand and is placed in the [redacted] that is used during training. The [redacted] is transferred to the [redacted]. During the time that the animal spends in the [redacted] SPECT/PET images of radioligand's biodistribution can be acquired. Stress of [redacted] will be monitored during [redacted] in terms of [redacted] inside the [redacted] and visual observation of [redacted]. If the animal shows signs of discomfort/stress (e.g. too high/low breathing or constantly [redacted] from [redacted] to the [redacted]), the experiment will be terminated. However, this behaviour is not expected since the animal is trained inside this [redacted] and only animals showing mild discomfort after training are used.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

Two types of animal procedures, 'Imaging of animals [redacted] (1) and [redacted] animal imaging' (2), will be used in this project. The basic outline of the animal procedures are as follows:

Procedure 1:

Acquisition of SPECT/PET/CT/OI images require presents of a radioligand (SPECT and PET) or contrast agent (CT and OI) in the animal. One or more radioligands or contrast agents will be injected.

Animal will be imaged [REDACTED]

Procedure 2:

Animal will be trained to be [REDACTED] in the [REDACTED] to minimize stress.

Acquisition of SPECT/PET/CT/OI images require presents of a radioligand (SPECT and PET) or contrast agent (CT and OI) in the animal. Selected radioligand or contrast agent will be injected.

Animal will be imaged [REDACTED]

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

Development of new components in the imaging devices requires different protocols. In this project we aim to cover all various developments that can be realized in the coming years. With these developments we want to ensure that, for example, fewer animals will be required to answer one research question. This can be achieved by either improving the image quality of a single scan (e.g. increasing visible number of details or functional parameters that can be extracted from the images) or prolonging possible duration of longitudinal follow-up scan sequence with one animal.

Further reduction of total number of animals required will be covered by our developments on standardization of imaging experiments. This aspect is addressed by developments on optimization of animal body position during the image acquisition. Dedicated animal holders (e.g. tooth holder for animal head or knee holder for orthopedic research) provides reproducible imaging with different animals and better monitoring of physiological parameters (e.g. respiration and cardiac triggering during the scan) by allowing better access to the sides of physiological signals (respiration, heart beat). Furthermore, by evaluation of the [REDACTED]-animal method, a new research methods will become available for behavioral studies and to minimize [REDACTED] influences of biodistribution and biosocial processes.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Imaging of animals [REDACTED]
2	[REDACTED] animal imaging
3	
4	
5	
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.zbo-ccd.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'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	1	Imaging of animals [REDACTED]

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

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.

Acquisition of SPECT/PET images requires presence of a radioligand (SPECT and PET) or contrast agent (CT and OI) inside the animal. Usually, selected radioligand or contrast agent will be injected while the animal is anesthetized (point 4). However, it may be needed to inject the contrast into an [REDACTED] animal (point 1). For example the anaesthesia can have an adverse effect on biodynamics of the ligand like 123I FP-CIT for visualization of dopamine transporters). Another example is that a few hours might be required for a radioligand or contrast agent to reach its optimal biodistribution within the animal.

With the latest developments in both [REDACTED] (Branderhorst et al. 2014), [REDACTED] (Ivashchenko et al. 2015) and the ability to image glucose at the same time (Goorden et al. 2013), new studies based on the previous results by Vastenhouw et al. will provide more details and new information improving accuracy of *in vivo* brain studies.

After administration of radioligand or contrast agents, biodistribution with SPECT/PET/CT/OI equipment will be performed.

Longitudinal follow-up imaging:

For some radioligands or contrast agents a relatively long time - hours to days - is required to reach their optimal biodistribution within the animal. At the same time, information on longitudinal changes in the biodistribution provides crucial information about the compound. Therefore, imaging of longitudinal changes in biodistribution will occasionally be required to optimize performance of the system for longitudinal follow-up imaging studies. In these cases 'Awakening from the anaesthesia' (point 5) and 'Housing of the animal' (point 6) will be required. Adding a radioligand or contrast agent, induction with anaesthesia, and scanning (points 1-4) will be repeated prior every imaging experiment. Between imaging sessions, animals will be housed under normal conditions (6).

After the end of the SPECT/PET/CT/OI scan, or the last scan in the case of longitudinal imaging, every animal will be euthanized.

- 90% of the experiments are terminal.
- up to 10% of the experiments can be repetitive (3, 5 and 6).
- Some procedures will be carried out occasionally (1, 5 and 6).

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

Point 1. Administration of radioligand or contrast agent in [REDACTED] animal

- a) Frequency: min 1, maximum 4
- b) Clinical effects: single i.p./i.v injection
- c) Nature and duration of the experiment: single administration (can be i.p., i.v., subcutaneous, oral or inhalation)
- d) Time interval between the experiments: if applicable, see 6
- e) Total duration of the experiment: short, less than 1 minute

Point 2.1 Induction of anaesthesia for imaging experiment with rats/mice

Induction: KMA-mix / isoflurane, single i.p./i.v. injection.

Maintenance (if less than 1.5 hours): Appropriate anaesthesia

- a) Frequency: min 1, maximum 4
- b) Clinical effects: loss of sensation and consciousness
- c) Nature and duration of the experiment: single i.p./i.v. injection
- d) Time interval between the experiments: if applicable see 4
- e) Total duration of the experiment: a few minutes to several hours

Point 2.2 Induction of the anaesthesia for imaging experiment with rabbits

If necessary, the tranquilizer medetomidine will be used, followed by:

Induction (A or B): Appropriate anaesthesia

Maintenance (I or II): Appropriate anaesthesia

- a) Frequency: min 1, maximum 3
- b) Clinical effects: loss of sensation and consciousness
- c) Nature and duration of the experiment: possible single injections
- d) Time interval between the experiments: if applicable see 4
- e) Total duration of the experiment: minimum 1, maximum 4 hours

Point 3. Administration of radioligand or contrast agent in anesthetized animal

Acquisition of SPECT/PET images requires presence of the radioligand in the animal. During this step, the radioligand of interest will be administered (i.p. or i.v.) in previously anesthetized animal.

- a) Frequency: min 1, maximum 4
- b) Clinical effects: none
- c) Nature and duration of the experiment: single injection (i.p., i.v., subcutaneous, oral or inhalation)
- d) Time interval between the experiments: if applicable see 6
- e) Total duration of the experiment: short

Point 4. Imaging with SPECT/PET/CT/OI equipment.

The animal is fixed in an animal bed while the scan is acquired. During the imaging experiment physiological parameters of the animal will be monitored. In case of imaging with CT / OI scanner: once, \pm 10 minutes.

- a) Frequency: min 1, maximum 4
- b) Clinical effects: none
- c) Nature and duration of the experiment: animals under anaesthesia
- d) Time interval between the experiments, if applicable see 6
- e) Total duration of the experiment: a few minutes to several hours

Point 5. Awakening from the anaesthesia (Occasionally)

- a) Frequency: min 1, maximum 3
- b) Clinical effects: animals wakes up in the controlled environment
- c) Nature and duration of the experiment: minutes
- d) Time interval between the experiments: see 6
- e) Total duration of the experiment: short

Point 6. Housing of the animals (Occasionally)

The animals are housed and checked daily under normal conditions in a designated area. Time interval between experiments is not less than one day. Follow-up studies of animals can be either short term (7 days) or long term (up to 30 days). Short term follow-up will show pharmacodynamics using the same animal up to a maximum of 4 times with at least 24 hours between two consecutive measurements. When long term follow-up of scans are required, steps 1 to 5 are repeated before each scan.

- a) Frequency: min 1, maximum 3
- b) Clinical effects: none
- c) Nature and duration of the experiment: animals are housed indoor
- d) Time interval between the experiments: a minimum of 24 hours between experiments
- e) Total duration of the experiment: up to 30 days

Point 7. Euthanasia

Overdose of euthanial (200 mg/mL pentobarbital, ip or iv injection), whole animal perfusion fixation or cervical dislocation after the last imaging experiment. Tissues/organs are optionally collected for further analysing.

- a) Frequency: once
- b) Clinical effects: death
- c) Nature and duration of the experiment: overdose of euthanial/cervical dislocation/perfusion fixation
- d) Time interval between the experiment: --
- e) Total duration of the experiment: short

Expected results: Optimization of both hardware and software parameters of the imaging system.

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

The scans will be one-off scans as proof-of-principal; no statistical methods are used for this.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

The experiments are conducted on mice, rats and rabbits since these animals are used worldwide in preclinical research. In 90% of the experiments, surplus mice and rats can be used from internal supply. Surplus rabbits are generally not available and therefore rabbits will need to be ordered. The age and sex of the animal is usually not important, but for some cases the weight (size) of the animal is important. In those cases, selection of younger or older animals from the surplus stock is preferred.

Based on 5 years statistics of previous experiments, estimate the number of animals needed for every testing procedure per year is as follows:

1) Various contrast agents -> 5

Such as optical imaging contrast agent, contrast medium and CT radioligands for dopamine receptor, bone, heart, glucose, brain blood flow, imaging of F18 distribution, etc. Contrast agents used in this experiment will be either standard available tracers, or tracers which have been already tested. As such information about i.e. toxicity will be known at time of experiment and will be- if required - addressed adequately in the experiment.

After this, performance of the equipment needs to be optimized for each radioligand:

2) Variations in equipment settings -> 4

Such as [redacted] size, [redacted] tube size, acquisition parameters etc.

3) Various concentrations of radioligand -> 2

4) Variations in experimental design -> 2

Terminal experiments or kinetic biodistribution over time

5) Species: mouse & rat -> 2

Number of unique experiments: -> $(5 \times 4 \times 2 \times 2 \times 1) \times 5 \text{ years} = 80 \text{ mice/year} \times 5 = 400 \text{ mice}$

Number of unique experiments: -> $(5 \times 4 \times 2 \times 2 \times 1) \times 5 \text{ years} = 80 \text{ rats/year} \times 5 = 400 \text{ rats}$

90% mild: 360 mice, 360 rats

10% moderate: 40 mice, 40 rats

The number of variations in experiments for rabbits is smaller:

1) Various contrast agents -> 3

Such as CT contrast agent and radioligands for dopamine receptor, bone, heart, brain blood flow, etc.

After this, performance of the equipment needs to be optimized for every radioligand type:

2) Variations in equipment settings -> 2

Acquisition duration, etc

3) Various concentrations of the radioligand -> 2

4) Variations in experimental design -> 2

Terminal experiments or kinetic biodistribution over time

5) minimum number of animals per group -> 1

Number of unique experiments: -> $24 \times 5 \text{ years} = 120 \text{ rabbits}$

90% mild: 108 rabbits

10% moderate: 12 rabbits

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

All animal experiments are terminal; in 90% of the cases the animal will be scanned only once, in 10% of the cases the animal is scanned multiple times. Longitudinal follow up imaging needs to be acquired to provide crucial information on dynamic changes in radioligand biodistribution within the animal. Due to the biological half-life, the radioligand is cleared from the animal. This lowers the signal strength over time for which the scanner needs to be optimized/adjusted. After the experiments, animals are radioactive which limits the re-use.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

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

All developments performed at ██████ are first extensively evaluated on plastic phantoms. In some cases, specific phantoms are developed and are available for researchers like the 3D rat brain (██████ et al. 2009). In addition, emulation software has been developed – and is also available for researchers - to optimize scan duration and injected dose based on previous acquisitions or only a single mouse acquisition. Visualization of biological processes in living animals, the main purpose of this equipment, can only be done in living animals.

Reduction & refinement (of experiment)

Reduction and refinement of animal experiments will be done by development of optimal imaging protocols, including the optimal amount of administered activity and image acquisition parameters (e.g. duration of scan, number ██████████ for new imaging components of SPECT/PET/CT/OI scanners: First, prior to the initial animal scan with a new scanner component, optimal scan parameters for animal scans will be estimated based on simulations and results of phantom- based evaluation (e.g. ██████████ and ██████████) of the component. After this, initial animal scan, with what is expected to be the “optimal” setup, will be performed. Next, image quality will be analyzed and, if needed, dedicated emulation software will be used to verify how changes in the protocol (e.g. lower ██████████ or different acquisition ██████████) influence the quality of *in vivo* scans. Results of these analyses will be iteratively compared with optimal imaging protocol setup and, if they show a possibility of significant image quality improvement, will be used for additional animal experiments. This scheme of imaging protocol development allows for iterative refinement of acquisition setup with minimal number of animals.

Refinement

This type of imaging equipment is specially designed for small animals, like mice, rats and rabbits. In this matter we optimize the experiments to get the best information per animal. Special animal beds including temperature control, animal monitoring are used to optimize imaging and animal conditions.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

To minimize possible stress and discomfort to the animal during radioligand or contrast agent administration, animals will shortly be anaesthetized. At the same time, physiological parameters of anesthetized animal (e.g. body temperature, respiration and or/ heart rate) will be monitored and regulated if needed.

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.

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 of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

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?

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.

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.

Discomfort or mild pain to the animal will be caused only during radioligand or contrast agent administration. To minimize possible discomfort of the animal, majority of injections will be carried with anaesthetized animal.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

In case of repetitive imaging, the animal could show these symptoms in rare cases:

1. Increased level of stress
2. Decrease in appetite and related weight loss
3. Signs of pain/behavioural changes

Explain why these effects may emerge.

Nature of possible adverse effects on animal's welfare during repetitive imaging over few days

1. Increased level of stress >> Repetitive imaging with one animal requires multiple awakening of the animal from the anaesthesia. Although the conditions of the awakening are optimized (e.g. use of external heating to keep body temperature of the animal), animals still experience stress due to disorientation and corresponding fear.

2. Decrease in appetite and related weight loss >> Might occur as a rare side effect of stress
3. Signs of pain /behavioural changes>> In rare cases radioligand or contrast agent administered in the animal during imaging can induce mild to moderate pain to the animal and/or cause temporary behavioural changes. However great care is taking into account using isotone contrast agents without side-affects.

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

Possible stress to the animal will be reduced by optimizing animal preparation procedures prior the imaging experiment. Use of anaesthesia during radio ligand administration and while imaging.

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.

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

Case of repetitive imaging with one animal.

1. Rapid weight loss of 15% within 2 days
2. Abnormally high respiration during long period of time
3. Behavioural changes
4. Signs of pain or discomfort that are not caused by expected discomfort of the experiment

Indicate the likely incidence.

All animal procedures described in this proposal are not expected to cause more than mild/moderate discomfort or pain to the animal. Therefore, occurrence of humane endpoint conditions is not expected and can be described as an outlier.

Based on our previous experience, not more than 2% animals/species per year reaches humane endpoint stage.

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').

90% Mild: Injection of contrast agent and single scan

10% Moderate: Injection of contrast agent and multiple scans. After each scan, the animal will recover from the anaesthesia causing discomfort/stress.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

90% of our experiments are terminal and requires use of animals for one imaging session. The presence of radioactivity might interfere with other experiments and longer *ex vivo* scans and/or tissue analysis is performed to validate *in vivo* scans. Overdose of euthanial (200 mg/mL pentobarbital, i.p. or i.v. injection), whole animal perfusion fixation or cervical dislocation of mice, and pentobarbital overdose of rats and rabbits.

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

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

Yes



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.zbo-ccd.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'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	2	Imaging of [redacted] animals

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

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.

The use of [redacted] during SPECT/PET brain imaging of animals can have profound effects on normal cerebral blood flow (Shtoyerman et al. 2000). For example oxygen metabolism rate, glucose utilization ([redacted] et al. 2006), receptor expression (Tassonyi et al. 2002), and perhaps even receptor occupancy can be affected. This suggests that SPECT/PET results obtained with [redacted] animals may not accurately report the variable of interest. To study [redacted] animals using SPECT/PET you need a [redacted] and very [redacted] system [redacted] et al. 2013) with [redacted] image [redacted] The [redacted]

SPECT/PET/CT/OI system nicely matches those requirements (van der Have et al. 2009; Goorden et al. 2013; Ivashchenko et al. 2015). Therefore, there is a need in development and optimization of SPECT/PET imaging equipment and protocols that allows imaging [redacted] animal. In this specific procedure we are optimizing [redacted] animal imaging.

Based on previous experience and in consultancy with the IvD, the animal is trained to [redacted] in a [redacted]. The [redacted] is transferred to the inside of the imaging device (SPECT/PET scanner). During the time that the animal [redacted] SPECT/PET images of radioligand's biodistribution are acquired. To track the [redacted] of animal's [redacted] in [redacted] will be positioned on the [redacted]. Signals from the [redacted] will be used for [redacted] of acquired images of radioligand's biodistribution.

Expected results: Optimization of hardware and software parameters for imaging of [redacted] animals for the first time using SPECT/PET.

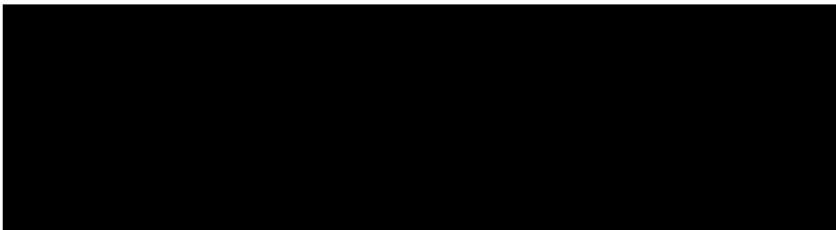
Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

The experiment is split into several parts:

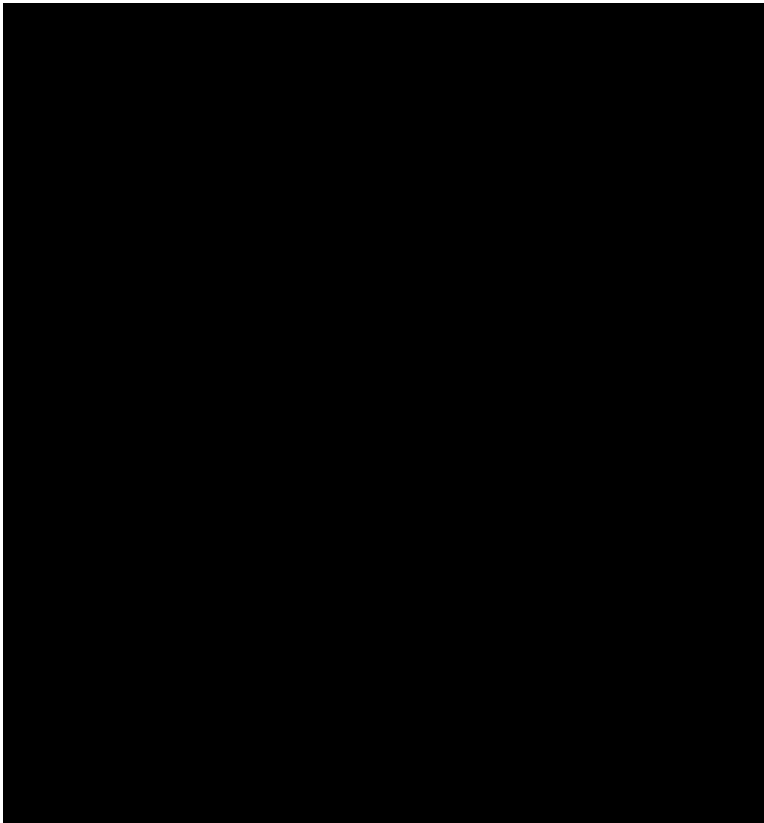
Point 1. Training period

To prevent high levels of stress during imaging, the animals will be trained to spend time in [redacted] to imaging experiment [redacted] [redacted] that allows [redacted] of the animal and containing enrichment material, over 2 weeks. Animal stress level is visually checked by an experience animal caretaker, looking at animal's posture and breathing rate.

The size of the [redacted] is [redacted] mm inner diameter, [redacted] to an inner diameter of [redacted] mm over [redacted] mm length, connected to a [redacted] of [redacted] mm long and [redacted] mm inner diameter (see image below).



This [redacted] part will go into the scanner, [redacted] the section with [redacted] diameter provides [redacted] room, even allows the animal to [redacted] (see image below).



Bedding and tissues are provided and the mouse has [REDACTED] these and is even able to [REDACTED] its [REDACTED] when the animal is inside the [REDACTED] section. The time spend in the [REDACTED] during training period will be gradually increased from 5 to maximum of 60 min, to minimize the stress at every time-point of the training.

- a) Frequency: 7 days of training
- b) Clinical effects: keeping the animal in [REDACTED]
- c) Nature and duration of the experiment: 5 to 60 min
- d) Time interval between the experiments: 1 to 3 days
- e) Total duration of the experiment: up to 10 days

Point 2. Animal preparation prior imaging experiment

- 1. Induction of the anaesthesia
Appropriate anaesthesia will be used

- a) Frequency: min 1 max 2
- b) Clinical effects: loss of sensation and consciousness
- c) Nature and duration of the experiment: single ip/iv injection
- d) Time interval between the experiments: --
- e) Total duration of the experiment: max 20 min

II. Placement of the [REDACTED]

[REDACTED] of the animal will be shaved in the places of [REDACTED] will be safely attached to animal's [REDACTED] (e.g. with a glue).

- a) Frequency: max 1
- b) Clinical effects: none
- c) Nature and duration of the experiment: max 10 min
- d) Time interval between the experiments: --
- e) Total duration of the experiment: max 10 min

III. Administration of radioligand

Single i.p. or i.v injection of the radioligand

- a) Frequency: max 1
- b) Clinical effects: single i.p/i.v. injection
- c) Nature and duration of the experiment: max 10 min
- d) Time interval between the experiments: --
- e) Total duration of the experiment: max 10 min

IV. [REDACTED] anaesthesia

- a) Frequency: max 1
- b) Clinical effects: animal [REDACTED] from [REDACTED] in [REDACTED]
- c) Nature and duration of the experiment: minutes
- d) Time interval between the experiments: --
- e) Total duration of the experiment: minutes/short

Point 3. Imaging with SPECT/PET equipment

- a) Frequency: max 1
- b) Clinical effects: trained animal is [REDACTED] in a [REDACTED]
- c) Nature and duration of the experiment: max 60 min
- d) Time interval between the experiments: --
- e) Total duration of the experiment: max 60 min

Point 4. Imaging with CT equipment

- a) Frequency: max 1
- b) Clinical effects: none
- c) Nature and duration of the experiment: max 20 min

- d) Time interval between the experiments: --
- e) Total duration of the experiment: max 20 min

Point 5. Euthanasia

Overdose of euthanial (200 mg/mL pentobarbital, i.p. or i.v. injection), whole animal perfusion fixation or cervical dislocation after the last imaging experiment. Tissues/organs are optionally collected for further ex vivo analysing.

- a) Frequency: once
- b) Clinical effects: death
- c) Nature and duration of the experiment: overdose of euthanial/cervical dislocation/perfusion fixation
- d) Time interval between the experiment: --
- e) Total duration of the experiment: short

During the SPECT/PET scan, ████████ of the animal – as an indication of stress - is monitored. When the animal is too stressed, the experiment will be terminated.

This experiment will show feasibility of imaging SPECT/PET animals while ████████ on different tracers and in mice and rats. This will enable other researchers to study ████████ animals using our system.

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

The scans will be one-off scans as proof-of-principal; no statistical methods are used for this.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

The experiments are conducted on mice and rats since these animals are used worldwide in preclinical research. In 90% of the experiments, surplus mice and rats can be used from internal supply. The age and sex of the animal is usually not important, but for some cases the weight (size) of the animal is important. In those cases, selection of younger or older animals from the surplus stock is preferred.

For each species we estimate this number of animals needed for every testing procedure per year

- 1) Various contrast agents -> 3

Such as radioligands for dopamine receptor, brain blood flow, imaging of F18 distribution, etc. Contrast agents used in this experiment will be either standard available tracers, or tracers which have been already tested. As such information about i.e. toxicity will be known at time of experiment and will be – if required - addressed adequately in the experiment.

After this, performance of the equipment needs to be optimized for every radioligand type:

- 2) Variations in equipment settings -> 2

Such as ████████ size, ████████ extensive acquisition parameters etc.

- 3) Various concentrations of radioligand -> 2

- 4) Variations in experimental design -> 2

- 5) Two species: mouse & rat -> 2

Number of unique experiments: -> $(3 \times 2 \times 2 \times 2 \times 1) \times 5 \text{ years} = 24 \text{ mice/year} \times 5 = 120 \text{ mice}$

Number of unique experiments: -> $(3 \times 2 \times 2 \times 2 \times 1) \times 5 \text{ years} = 24 \text{ rats/year} \times 5 = 120 \text{ rats}$

100% moderate: 120 mice, 120 rats

C. Re-use

Will the animals be re-used?

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'?

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

All developments performed at ██████ are first extensively evaluated on plastic phantoms. In some cases, specific phantoms are developed and are available for researchers like the 3D rat brain (██████ et al. 2009). In addition, emulation software has been developed – and is also available for researchers - to optimize scan duration and injected dose based on previous acquisitions or only a single mouse acquisition. Visualization of biological processes in living animals, the main purpose of this equipment, can only be done in living animals.

Reduction & refinement (of experiment)

Reduction and refinement of animal experiments will be done by development of optimal imaging protocols, including the optimal amount of administered activity and image acquisition parameters (e.g. duration of scan).

First, prior to the initial animal scan with a new scanner component, optimal scan parameters for animal scans will be estimated based on simulations and results of phantom-based evaluation (e.g. ██████ and ██████) of the component. After this, initial animal scan, with what is expected to be the "optimal" setup, will be performed. Next, image quality will be analyzed and, if needed, dedicated emulation software will be used to verify how changes in the protocol (e.g. lower activity or different acquisition time) influence the quality of *in vivo* scans. Results of these analyses will be iteratively compared with optimal imaging protocol setup and, if they show a possibility of significant image quality improvement, will be used for additional animal experiments. This scheme of imaging protocol development allows for iterative refinement of acquisition setup with minimal number of animals.

Refinement

This type of imaging equipment is specially designed for small animals, like mice and rats. In this matter we optimize the experiments to get the best information per animal. Special animal beds including temperature control, animal monitoring are used to optimize imaging and animal conditions.

Based on previous experiments and in consultancy with the IvD, a dedicated training of the animals to be ██████ will reduce the stress while animal is scanned ██████ is monitored during acquisition and experiment will be ended when signs of stress are evident. Training of the animals

before the actual experiment will reduce the stress during the experiment. Furthermore, the animals will not experience the [REDACTED] of [REDACTED] stress. Measuring biological processes while the animal is [REDACTED] provides new ways to study the animal in a much more similar way human imaging and studies are performed. Animal behavior, including shape and breathing, is monitored and the animal is able to [REDACTED] and [REDACTED] inside the [REDACTED].

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

To minimize possible stress and discomfort to the animals during radioligand's administration animals will shortly be anaesthetized. The level of stress during [REDACTED] animal imaging with SPECT/PET scanners will be minimized by previous familiarization of the animal with the [REDACTED] environment. This will be done by longitudinal training of the animal on spending gradually increasing time in the [REDACTED] (represents similar to [REDACTED]).

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.

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 of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

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?

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.

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.

Discomfort or mild pain to the animal might be caused only during the injection of radioligand and/or [REDACTED] on the [REDACTED] of the animal. To minimize possible discomfort to the animal, these procedure will be performed with slightly anaesthetized animals.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

In rare cases animals might show these symptoms of stress during the training period:

1. Increased level of stress
2. Decrease in appetite and related weight loss

Explain why these effects may emerge.

Nature of possible adverse effects on animal's welfare during repetitive imaging over few days

1. [REDACTED] the animals will compromise [REDACTED] however the [REDACTED] is [REDACTED] and the training will reduce their stress levels.
2. Decrease in appetite and related weight loss >> Might occur as a rare side effect of stress

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

- Pace of gradual increase in the training time/day will be adapted to individual response of the animal on the training procedure
- Animal weight will be monitored

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.

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

1. Weight loss of 15% within 2 days
2. Abnormally high respiration during long period of time
3. Behavioural changes
4. Signs of pain or discomfort that are not caused by expected discomfort of the experiment

Indicate the likely incidence.

All animal procedures described in this proposal are not expected to cause more than mild/moderate discomfort or pain to the animal. Therefore, occurrence of humane endpoint conditions is not expected and can be described as an outlier.

Based on our previous experience, not more than 2% animals/specie per year reaches humane endpoint stage. Since the [REDACTED]-animal scan protocol involves more stress and training for the animal compared to our previous protocols, we expect human end point probability will not be higher than 5%.

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').

Mild: contrast agent administration

Moderate with gradual decrease to mild: decrease in the level of stress during training period (point 1)

To minimize the amount of stress during imaging of [REDACTED] animal, it will be trained to spend time in a [REDACTED] to imaging [REDACTED] [REDACTED] that allows [REDACTED] of the animal and containing enrichment material) over 2 weeks. The amount of stress during every time-point of the training will be minimized by gradual increase of time spend in the [REDACTED], from 5 minutes on the first day to 60 minutes at the end of the training.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

90% of our experiments are terminal and requires use of animals for one imaging session. Presence of radioactivity may interfere with other experiments, longer ex vivo scans and/or tissue analysis is performed to validate in vivo scans of the brain. Overdose of euthanial (200 mg/mL pentobarbital, i.p. or i.v. injection), whole animal perfusion fixation or cervical dislocation of mice, and pentobarbital overdose of rats.

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

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

Yes

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2015.II.527.017
2. Titel van het project : Molecular Imaging of laboratory animals
3. Titel van de NTS : Moleculaire beeldvorming van proefdieren

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: 23-10-2015
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 04-11-2015
- anderszins behandeld: 18-11-2015
- termijnonderbreking(en) van / tot : 09-11-2015 tot 17-11-2015
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 11-12-2015

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: 09-11-2015
- Strekking van de vragen:

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: Het project richt zich in feite op het voortdurend, stap voor stap, verbeteren van scanners voor kleine proefdieren die gebruikt worden in het onderzoek. Het verhaal is

wat te algemeen en te summier. De DEC acht het noodzakelijk dat u uitgebreider aangeeft wat de voornaamste beperkingen zijn van de huidige scanners en aan welk type verbeteringen behoefte is en waarom. Streven de onderzoekers bijvoorbeeld naar [REDACTED] op het niveau van activiteit van [REDACTED] in de hersenen? Daarbij is het overigens niet nodig in detail te treden over de technische middelen waarmee de verbeteringen worden gerealiseerd.

- 3.2 Doelstelling: Veel van wat er in uw antwoord staat is achtergrond die beter op zijn plaats is in 3.1. De doelstelling van uw onderzoek is vrij eenvoudig: u wilt voortdurend, stap voor stap verbeteringen aanbrengen in uw scanners en u wilt die verbeteringen in laatste instantie ook kunnen testen in levende dieren.
- 3.3 Belang: Een groot deel van 3.3 is achtergrond en mag naar 3.1 voor zover nodig. De concrete verbeteringen en wat die opleveren in termen van additionele wetenschappelijke data en verfijning voor de proefdieren, komen niet goed uit de verf. Het belang van een sterke verhoging van de [REDACTED] en [REDACTED] zou bijvoorbeeld wel eens zeer groot kunnen zijn, omdat allerlei zeer invasief onderzoek in levende, [REDACTED] dieren daardoor achterwege kan blijven.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: U geeft aan dat u een dier uit de scanner zult halen als het te gestrest is. Uw maatstaf is daarbij of het dier te veel [REDACTED]. De commissie vraagt zich af of dat wel een adequate maatstaf is. Het lijkt eerder slechts een maatstaf voor de vraag of de opname/registratie zal slagen. Graag uw visie op dit punt.

Bijlage 1

- D. Vervanging, vermindering en verfijning: De tekst onder reduction & refinement heeft vrijwel uitsluitend betrekking op de vermindering en verfijning die bereikt kan worden met de verbeterde scanners. Hier wordt echter gevraagd naar vermindering en verfijning in dit experiment.
- K. Classificatie van ongerief: Bij de 10% van de dieren die matig ongerief ondergaan zou voor de duidelijkheid vermeld moeten worden dat "multiple scans" met zich meebrengen dat de dieren meerdere keren ontwaken uit anesthesie (dat veroorzaakt namelijk het ongerief).

Bijlage 2

- K. Classificatie van ongerief: De dieren moeten voordat ze de scanner in gaan getraind worden. Daarover wordt niets vermeld in de tekst, terwijl verwacht mag worden dat juist tijdens het begin van de training sprake is van matige [REDACTED] die daarna afneemt tot gering (als het goed is). Graag vermelden wat het verwachte ongerief is van deze training, en dit verwerken in de tekst. De DEC vraagt zich overigens af in hoeverre er sprake is van [REDACTED] als u bijvoorbeeld gebruik zou kunnen maken van de [REDACTED] die ook als [REDACTED] worden gebruikt. Wellicht kunt u als onderbouwing van de ongeriefinschatting bij vraag 2A iets uitvoeriger toelichten hoe de dieren precies in de scanner worden geplaatst. De DEC heeft een voorkeur voor de aanduiding "initieel matig en na gewenning afnemend

tot licht". Mocht u een andere inschatting hebben, dan vermeent de DEC graag de argumenten daarvoor.

Niet Technische Samenvatting

- 3.4 Verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren: Er staat niets over de procedure met de dieren die ██████ zijn tijdens het scannen. Het ongerief van de training van de dieren ontbreekt.
- 3.5 Indeling dierproeven naar de verwachte ernst: U vermeldt hier alleen de ongeriefinschatting voor de dieren in bijlage 1 en vergeet het ongerief van de dieren in bijlage 2.

- Datum antwoord: 17-11-2015
- Strekking van de antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: Inderdaad, de ██████ – maar ook de ██████ – kunnen (en moeten) steeds beter worden zodat in meer ██████ gekeken kan worden naar biologische processen. In combinatie met de stukken uit 3.2 en 3.3 wordt hier dieper op ingegaan.
- 3.2 Doelstelling: Veel van de tekst naar 3.1 verplaatst. Daarnaast is het doel voor ██████ scannen verduidelijkt.
- 3.3 Belang: Veel van de tekst naar 3.1 verplaatst. Daarnaast is het belang van verbeteringen voor wetenschappelijk studies en verfijning van proefdieren verder uitgewerkt zowel in termen van ██████ als het scannen van ██████ dieren.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: Het ██████ van het dier in de scanner is geen probleem, doordat er gebruik wordt gemaakt van ██████ is precies ██████ het dier - en in ██████ - zich ██████. Er worden continue volledige 3D opnames gemaakt (listmode) en op basis van de ██████ zal achteraf een correctie worden toegepast voor de ██████ van het dier. De mate van ██████ zal hierdoor eerder een maat voor stress zijn om het dier uit te proef te nemen dan dat we de data niet kunnen gebruiken.

Bijlage 1

- D. Vervanging, vermindering en verfijning: Reduction en refinement toegevoegd welke betrekking hebben op het experiment (fantomen, simulaties en emulatie software).
- K. Classificatie van ongerief: Oorzaak van het matige ongerief als gevolg van ontwaken toegevoegd.

Bijlage 2

- K. Classificatie van ongerief: In de tekst (2A) toegevoegd dat de dieren getraind worden om stress te verminderen. Ons inziens zal er, ondanks de training, toch sprake zijn van ██████ tijdens het scannen aangezien de ██████ is in de scanner: ██████ van de ██████ is ██████ mm in diameter dat over ██████ mm ██████ diameter, ██████ is een stuk van ██████ lang van ██████ doorsnede dat de scanner in gaat. Deze informatie is

toegevoegd aan Bijlage 2, A2. Het ongerief van training "initieel matig en na gewenning afnemend tot licht" is toegevoegd.

Niet Technische Samenvatting

- De NTS is een tweede keer door de communicatieadviseur gereviewed, de aanpassingen hiervan zijn ook in het rood aangegeven. Toegevoegd de dieren getraind worden om [REDACTED] te [REDACTED] tijdens het onderzoek, alsmede het ongerief toegevoegd bij 3.5.
- 3.5 Indeling dierproeven naar de verwachte ernst: Het ongerief voor de dieren in bijlage 2 is toegevoegd.

- Datum: 25-11-2015

- Strekking van de vragen:

- Allereerst wil de DEC kenbaar maken dat zij uw aanvraag volledig begrijpt en goed kan toetsen.

Echter wil de DEC u graag meegeven dat u de aanvraag en de NTS nogmaals grondig checkt op verkeerd gespelde woorden, ontbrekende woorden, woorden die in een verkeerde betekenis gebruikt worden en niet goed lopende of onvolledige zinnen. Kijk of er staat wat u wilt zeggen. Formuleer exact en zorg dat de tekst maar voor een uitleg vatbaar is. Inzending naar de CCD met de huidige hoeveelheid fouten raadt de DEC sterk af.

Bijvoorbeeld: Het trainen van de dieren die [REDACTED] gescand worden zal matig ongerief geven dat gedurende de gewenning afneemt tot licht (NTS 3.5) moet worden veranderd in: Het trainen van de dieren die [REDACTED] gescand zullen worden zal matig ongerief veroorzaken. De verwachting is dat de dieren, als ze eenmaal getraind zijn, niet meer dan licht ongerief zullen ervaren door het [REDACTED] in de scanner. Een ander voorbeeld van een niet goed te begrijpen zin: Wat betekent de nieuw ingevoerde zin op pagina 6 van de projectbeschrijving onder reduction: '... and will be distributed between all users of the scanners, also published in peer-reviewed journals.' Wat bedoelt u met deze zin in deze context?

- De DEC vraagt zich nog het volgende af: Hoe scoort u dat het ongerief tot licht is gedaald na de trainingsperiode voordat de echte metingen beginnen: 'Animals are gradually trained to spend time in a [REDACTED] that allows for [REDACTED] inside [REDACTED] inside the [REDACTED] Is [REDACTED] mm diameter echt [REDACTED]'
- Hoe vaak zal het volgende voorkomen: 'If the animal shows signs of discomfort/stress (e.g. [REDACTED] between [REDACTED] or too [REDACTED] the experiment will be terminated'. Wat bedoelt u met [REDACTED] (3.4.1)?
- Verder raadt de DEC u aan om de IvD te betrekken bij het beantwoorden van de vragen. De DEC wil u verder nog als tip mee geven om alleen de gevraagde informatie te verstrekken en de juiste informatie bij de juiste vraag te zetten.
- Datum antwoord: 07-12-2015
- Strekking van de antwoorden:

- Met de zin op pagina 6 willen we aangeven dat de ervaringen gedeeld worden met gebruikers zodat hun experimenten beter gepland en uitgevoerd worden. Dit is geen verfijning van de huidige proef en is eruit gehaald.
- Op basis van het gedrag van de dieren na de laatste training waarbij door iemand met veel ervaring gekeken wordt naar de ademhaling en houding. Dit is toegevoegd. Er is een tekening en foto toegevoegd van de [REDACTED], en extra informatie toegevoegd zoals dat de muis gebruik maakt van de kooiverrijking en zich aan het [REDACTED] van de [REDACTED] zelfs zou kunnen [REDACTED]
- Tot nu toe hebben we bij pilotexperimenten geen [REDACTED] gezien. Hiermee bedoelen we dat de muis [REDACTED] in het [REDACTED] van de [REDACTED] de [REDACTED] [REDACTED]. Dit is nu in de projectaanvraag anders geformuleerd. Daarnaast zijn de dieren getraind en zullen ze alleen in experiment gaan wanneer ze niet gestrest zijn.
- 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

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 hoofddoelstelling.
 Het onderzoek in dit project is fundamenteel en translationeel van aard. Zowel voor het basale als het translationeel farmacokinetisch hersenonderzoek is het essentieel over optimale imaging

technieken met hoge [REDACTED] en [REDACTED] beschikken die nodig zijn om biologische processen *in vivo* zichtbaar te maken. De twee delen van dit onderzoek (imaging [REDACTED] en daarna imaging in [REDACTED] dieren) volgen elkaar logisch op en zijn essentieel voor het realiseren van de hoofdoelstelling (optimaliseren van [REDACTED] en [REDACTED] van preklinische dynamische imaging in kleine dieren).

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang.

Het onderzoek richt zich op het substantieel verbeteren van 3D *in vivo* scanning technieken. De door [REDACTED] ontwikkelde 'state-of-the-art' Spect/PET/CT/OI scanning technieken geven naast anatomische beelden ook informatie over de biodistributie van opgenomen geneesmiddelen of andere radiofarmaca. Het is van essentieel belang voor neurobiologisch onderzoek en/of de verdere ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën om continu de [REDACTED] en [REDACTED] van imaging m.b.t. de farmacokinetiek van toegediende stoffen te verbeteren. Verder is de toename van de tijd waarmee radiofarmaca gevolgd kunnen worden in [REDACTED] dieren van zeer grote waarde.

Dit nieuwe onderzoek waarbij met hoge [REDACTED] opnames gemaakt kunnen worden van de hersenen gedurende relatief lange tijd in [REDACTED] dieren is ook van groot belang voor translationeel gedragsonderzoek. 3D hersenscanning met hoge resolutie (tot op [REDACTED] en met de mogelijkheid snelle fysiologische processen te kunnen vervolgen bij [REDACTED] dieren, zal in de toekomst zwaar belastend, invasief onderzoek kunnen vervangen.

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. Verbetering van de *in vivo* scanning technieken draagt bij tot het verminderen van *ex vivo* autoradiografische en histologische onderzoeken die momenteel gebruikt worden en waarbij, om voldoende meetpunten te kunnen verzamelen, grote aantallen dieren nodig zijn. Verder is de beoogde verhoogde [REDACTED] in dieren onder [REDACTED] en in [REDACTED] dieren met langere opnametijden van essentieel belang voor het translationele geneesmiddelenonderzoek.

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. Het ongerief bij het scannen in de [REDACTED] dieren zal beperkt blijven tot gering ongerief, doordat de dieren eerst getraind worden voor de scanning in een betrekkelijk [REDACTED]. Tijdens de training zal het ongerief aanvankelijk wel matig zijn, maar dit neemt af tot licht ongerief zodra de dieren er aan gewend zijn.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. In de beginfase van het onderzoek wordt steeds gebruik gemaakt van fantoommodellen. Dieren worden pas in het onderzoek ingezet in de latere fasen als 'proof of principle'.
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.
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.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

De DEC oordeelt dat de doeleinden van het project het voorgestelde gebruik van dieren (muizen, ratten en konijnen) rechtvaardigt. Het overgrote deel (90%) van de dieren ondervindt op z'n hoogst licht ongerief. In 10% van de dieren is er sprake van matig ongerief gedurende de periode dat de dieren getraind worden voor de scanning in [REDACTED]. Tijdens de training zal het ongerief langzaam afnemen naar gering. Het perspectief dat de verworven kennis bijdraagt aan een substantiële verbetering van de [REDACTED] en [REDACTED] van hersenscans in [REDACTED] dieren en aan het translationeel biodynamisch en biologisch moleculair onderzoek in de hersenen rechtvaardigt volgens de DEC het gebruik van dieren. De DEC wil hier nog onderstrepen dat het ontwikkelen van deze nieuwe herhaalbare niet-invasieve SPECT/PET/CT/OI studies in één dier het totale aantal dieren nodig voor het beantwoorden van biologische vragen drastisch kan verlagen. Het onderzoek is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en het is waarschijnlijk dat de doeleinden worden gehaald binnen 5 jaar. Op termijn kan het project belangrijke voordelen opleveren voor mens en dier.

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.

Dierexperimentencommissie Utrecht



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

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
AVD115002015352

Bijlagen

2

Datum 16 december 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 16 december 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002015352. 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: 11500
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: ██████████
KvK-nummer: 30244197
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
IBAN: NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ████████████████████
Functie: ████████████████
Afdeling: ██
Telefoonnummer: ████████████████
E-mailadres: ████████████████████████████████████

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? 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 2021
Titel project: Molecular Imaging of laboratory animals
Titel niet-technische samenvatting: Moleculaire beeldvorming van proefdieren
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht



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
AVD115002015352

Bijlagen

2

Datum 16 december 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 16 december 2015

Vervaldatum: 15 januari 2016

Factuurnummer: 15700352

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD115002015352	€ 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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007
3501AA 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
Aanvraagnummer
AVD115002015352

Uw referentie

Bijlagen

Datum 7 januari 2016

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 11 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Molecular Imaging of laboratory animals' met aanvraagnummer AVD115002015352. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

- In het projectvoorstel bijlage van uw aanvraag schrijft u verschillende testen en proeven met muizen, ratten en konijnen te willen uitvoeren. Heeft u go/no-go of beslismomenten in uw opzet opgenomen? U wordt verzocht in het kader van vermindering go/no-go momenten vast te stellen (zowel bij de start van een dierproef, tussen de behandelingen binnen een proef, als tussen de verschillende dierproeven), de criteria te beschrijven op welke wijze bepaald zal worden of wel/niet met een dierproef gestart gaat worden.
- U schrijft in uw aanvraag muizen, ratten en konijnen te willen gebruiken. Het is voor ons niet duidelijk of elke test met alle drie diersoorten uitgevoerd wordt, en/of op basis van welke criteria wordt er voor één of meerdere diersoorten gekozen. In het kader van vermindering en verfijning verzoeken we u deze criteria te beschrijven.
- In de bijlage dierproeven 2, 'Imaging of [REDACTED] animals', beschrijft u een [REDACTED] te willen gebruiken van de aangegeven metingen. Het is voor ons niet duidelijk of dezelfde [REDACTED] met dezelfde metingen, ook voor ratten wordt gebruikt of alleen

voor muizen. In het kader van dierenwelzijn zouden wij graag willen weten of er voor de ratten, indien het geval, een aangepaste [REDACTED] wordt gebruikt.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Gebruik hierbij het formulier dat u bij deze brief krijgt indien u uw antwoord per post verstuurt.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is. 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.

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.



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.
- | | |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- | | | |
|--------------|---|------|
| Naam | | |
| Datum | - | - 20 |
| Handtekening | | |
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht
t.a.v. [REDACTED]
Postbus 12007
3501AA 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
Aanvraagnummer
AVD115002015352

Uw referentie

Bijlagen

Datum 7 januari 2016
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 11 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Molecular Imaging of laboratory animals' met aanvraagnummer AVD115002015352. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

- In het projectvoorstel bijlage van uw aanvraag schrijft u verschillende testen en proeven met muizen, ratten en konijnen te willen uitvoeren. Heeft u go/no-go of beslismomenten in uw opzet opgenomen? U wordt verzocht in het kader van vermindering go/no-go momenten vast te stellen (zowel bij de start van een dierproef, tussen de behandelingen binnen een proef, als tussen de verschillende dierproeven), de criteria te beschrijven op welke wijze bepaald zal worden of wel/niet met een dierproef gestart gaat worden.
- U schrijft in uw aanvraag muizen, ratten en konijnen te willen gebruiken. Het is voor ons niet duidelijk of elke test met alle drie diersoorten uitgevoerd wordt, en/of op basis van welke criteria wordt er voor één of meerdere diersoorten gekozen. In het kader van vermindering en verfijning verzoeken we u deze criteria te beschrijven.
- In de bijlage dierproeven 2, 'Imaging of [REDACTED] animals', beschrijft u een [REDACTED] te willen gebruiken van de aangegeven metingen. Het is voor ons niet duidelijk of dezelfde [REDACTED], met dezelfde metingen, ook voor ratten wordt gebruikt of alleen

voor muizen. In het kader van dierenwelzijn zouden wij graag willen weten of er voor de ratten, indien het geval, een aangepaste [REDACTED] wordt gebruikt.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Gebruik hierbij het formulier dat u bij deze brief krijgt indien u uw antwoord per post verstuurt.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is. 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.

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.

Utrecht, 13-01-2016

Geachte Centrale Commissie Dierproeven,

Hartelijk dank voor het beoordelen van de Aanvraag projectvergunning dierproeven (AVD115002015352) en de gestelde vragen. Uw vragen heb ik onderaan deze brief beantwoord en toegelicht.

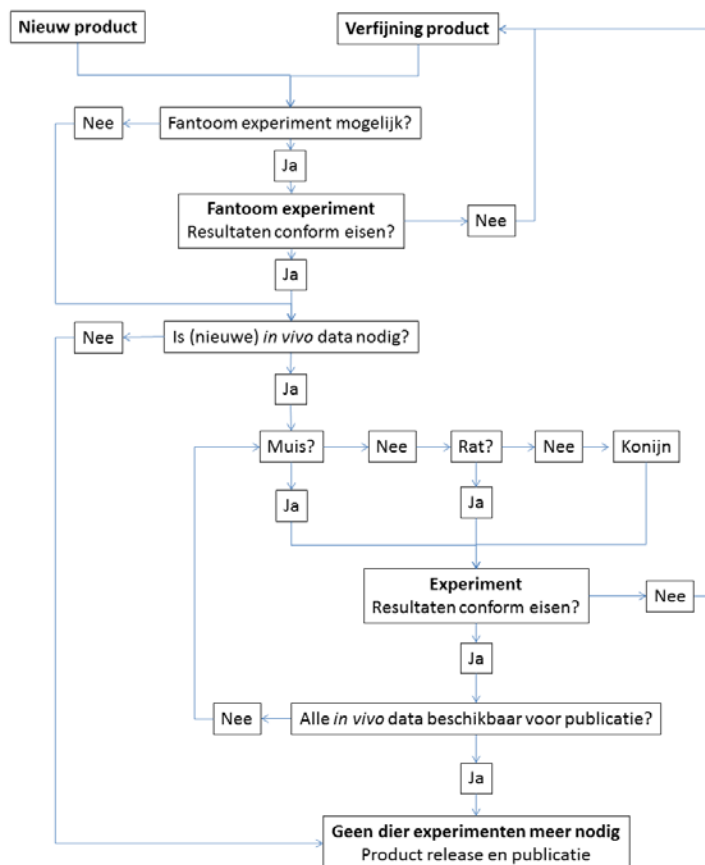
In afwachting van uw reactie,

Met vriendelijke groet,

██████████

- In het projectvoorstel bijlage van uw aanvraag schrijft u verschillende testen en proeven met muizen, ratten en konijnen te willen uitvoeren. Heeft u go/no-go of beslismomenten in uw opzet opgenomen? U wordt verzocht in het kader van vermindering go/no-go momenten vast te stellen (zowel bij de start van een dierproef, tussen de behandelingen binnen een proef, als tussen de verschillende dierproeven), de criteria te beschrijven op welke wijze bepaald zal worden of wel/niet met een dierproef gestart gaat worden.

De go/no-go beslismomenten zijn inderdaad niet helder weer gegeven in de projectaanvraag. Onderstaand beslisschema geeft aan hoe de uiteindelijke afweging voor het gebruik van proefdieren en de behandeling wordt genomen. Uiteraard zal dit kader alleen gelden voor de experimenten en handelingen zoals beschreven zijn in de aanvraag.



Hierbij zijn de belangrijkste go/no-go beslis momenten verder uitgewerkt voor:

Is (nieuwe) *in vivo* data nodig?

- Zijn *in vivo* experimenten nodig voor publicatie en productgegevens? Ja -> go
- Kunnen reeds bestaande *in vivo* beelden opnieuw gebruikt worden (bijvoorbeeld door nieuwe software reconstructies)? Ja -> no-go

Experiment | Resultaten conform eisen?

- Zijn de resultaten van de experimenten conform de eisen van het product? Ja -> go
- Indien het een longitudinale studie is, en het mocht blijken dat de 1^e scan niet conform de eis is, zal het experiment gestopt worden -> no-go. Indien wenselijk en mogelijk zal het product verfijnd/her-ontworpen worden alvorens een nieuwe go/no-go overwogen wordt.

Alle *in vivo* data beschikbaar voor publicatie?

- Is alle data beschikbaar, bijvoorbeeld is de power genoeg om een significant verschil te laten zien (indien nodig)? Ja -> no-go. Soms volstaat een enkele scan alleen voor de onderbouwing van de techniek.
- De power is niet hoog genoeg, er kunnen nog experimenten gedaan worden (bijvoorbeeld scan instellingen of andere radioactiviteit, verfijning binnen de experimentele setup). Ja -> go
- Is het noodzakelijk voor publicatie om andere dieren (muis/rat/konijn) te gebruiken? Ja -> go

- U schrijft in uw aanvraag muizen, ratten en konijnen te willen gebruiken. Het is voor ons niet duidelijk of elke test met alle drie diersoorten uitgevoerd wordt, en/of op basis van welke criteria wordt er voor één of meerdere diersoorten gekozen. In het kader van vermindering en verfijning verzoeken we u deze criteria te beschrijven.

Het meest gebruikte proefdier in nucleair onderzoek is de muis; hierdoor zal deze in de meeste gevallen als eerste gebruikt worden. Meestal zijn de ontwikkelingen specifiek voor 1 diersoort of is het alleen maar mogelijk om ontwikkelingen te verifiëren met 1 diersoort. Er zijn ook specifieke ontwikkelingen voor rat of konijn (bijvoorbeeld nieuwe specifieke hardware (collimator) voor hogere [REDACTED] of [REDACTED]; hiervoor zullen deze dieren dan gebruikt worden. Deze opstellingen voor grote dieren zouden ook voor een kleinere diersoort gevalideerd kunnen worden. Bijvoorbeeld het product voor konijnen moet ook voor ratten gevalideerd worden. Dan gebruiken we meerdere diersoorten in het product.

- In de bijlage dierproeven 2, 'Imaging of [REDACTED] animals', beschrijft u een [REDACTED] te willen gebruiken van de aangegeven metingen. Het is voor ons niet duidelijk of dezelfde [REDACTED] met dezelfde metingen, ook voor ratten wordt gebruikt of alleen voor muizen. In het kader van dierenwelzijn zouden wij graag willen weten of er voor de ratten, indien het geval, een aangepaste [REDACTED] wordt gebruikt.

De experimenten met [REDACTED] dieren zullen aanvankelijk alleen met muizen worden uitgevoerd. Pas wanneer blijkt dat de beelden van goede kwaliteit zijn en de opstelling goed werkt, vindt er mogelijk een vervolgstap plaats naar de ratten. Hiervoor zal de [REDACTED] opgeschaald worden voor ratten. De diameter van de [REDACTED] zal dan \emptyset [REDACTED] mm zijn.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag
UMC Utrecht

t.a.v. Instantie voor Dierenwelzijn
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
AVD115002015352
Bijlagen

1

02 FEB. 2016

Datum
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 16 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Molecular Imaging of laboratory animals" met aanvraagnummer AVD115002015352. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 19 januari 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft gereageerd op de gestelde vragen.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij geldt de algemene voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "Molecular Imaging of laboratory animals" starten. De vergunning wordt afgegeven van 2 februari 2016 tot en met 1 januari 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 11 december 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij nemen het advies van de Dierexperimentencommissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Met het oog op artikel 10a1 wordt een algemene voorwaarde 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


Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Aanvraagformulier
 - 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: UMC Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 2 februari 2016 tot en met 1 januari 2021, voor het project "Molecular Imaging of laboratory animals" met aanvraagnummer AVD115002015352, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker. Voor de uitvoering van het project is Principal Investigator verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 16 december 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 december 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 december 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 11 december 2015, ontvangen op 11 december 2015.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 19 januari 2016

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Imaging of animals [redacted]	Muizen (Mus musculus)	400	Matig / moderate	90% van de dieren zullen licht ongerief ondervinden en 10% matig ongerief.
Imaging of animals [redacted]	Ratten (Rattus norvegicus)	400	Matig / moderate	90% van de dieren zullen licht ongerief ondervinden en 10% matig ongerief.
Imaging of animals [redacted]	Konijnen (Oryctolagus cuniculus)	120	Matig / moderate	90% van de dieren zullen licht ongerief ondervinden en 10% matig ongerief.
Imaging of [redacted] animals	Muizen (Mus musculus)	120	Matig / moderate	Licht ongerief: contrast agent toedienen Matig ongerief: testen
Imaging of [redacted] animals	Ratten (Rattus norvegicus)	120	Matig / moderate	Licht ongerief: contrast agent toedienen Matig ongerief: testen

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

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 Instantie voor Dierenwelzijn 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.

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 2 februari 2016 10:42
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Beschikking AVD115002015352
Bijlagen: Beschikking AVD115002015352.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
.....

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 2 februari 2016 14:45
Aan: dec-utrecht@umcutrecht.nl
Onderwerp: terugkoppeling besluit op aanvraag AVD115002015352

Geachte DEC,

Enige tijd geleden heeft u advies uitgebracht op een aanvraag voor een projectvergunning met titel 'Molecular Imaging of laboratory animals' en aanvraagnummer AVD115002015352, uw kenmerk: 2015.II.527.017. Wij danken u voor uw advies, en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug.

De CCD heeft de volgende vragen aan de aanvrager gesteld:

- In het projectvoorstel bijlage van uw aanvraag schrijft u verschillende testen en proeven met muizen, ratten en konijnen te willen uitvoeren. Heeft u go/no-go of beslismomenten in uw opzet opgenomen? U wordt verzocht in het kader van vermindering go/no-go momenten vast te stellen (zowel bij de start van een dierproef, tussen de behandelingen binnen een proef, als tussen de verschillende dierproeven), de criteria te beschrijven op welke wijze bepaald zal worden of wel/niet met een dierproef gestart gaat worden.

- U schrijft in uw aanvraag muizen, ratten en konijnen te willen gebruiken. Het is voor ons niet duidelijk of elke test met alle drie diersoorten uitgevoerd wordt, en/of op basis van welke criteria wordt er voor één of meerdere diersoorten gekozen. In het kader van vermindering en verfijning verzoeken we u deze criteria te beschrijven.

- In de bijlage dierproeven 2, 'Imaging of █████ animals', beschrijft u een █████ te willen gebruiken van de aangegeven metingen. Het is voor ons niet duidelijk of dezelfde █████ met dezelfde metingen, ook voor ratten wordt gebruikt of alleen voor muizen. In het kader van dierenwelzijn zouden wij graag willen weten of er voor de ratten, indien het geval, een aangepaste █████ wordt gebruikt.

De aanvrager heeft naar tevredenheid gereageerd.

De CCD heeft besloten de vergunning, overeenkomstig uw advies, te verlenen.
De aanvrager en 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

Inventaris Wob-verzoek W16-12S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015355								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x		x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x					
5	DEC-advies			x					
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
8	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	
11	Mail beschikking 1-2-2016				x		x	x	

21 DEC 2015

AVD 108002015355



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
 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	3 0 2 7 5 9 2 4

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	Instatie 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]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> 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]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> 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 | | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> 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 | 0 1 . 0 2 . 2 0 1 6 |
| Einddatum | 0 1 . 0 2 . 2 0 1 8 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Effecten van probiotica in een muismodel voor allergische astma
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Effect van gezondheidsbevorderende bacterien in een muismodel voor allergische astma
- 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 | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 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
- Beschrijving dierproef 3.4.4.1

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 1.6). 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

Functie

Plaats

Datum

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.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

- 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.

Allergische astma is een steeds meer voorkomende chronische aandoening van de luchtwegen. Volgens de Wereld Gezondheid Organisatie lijden ruim 235 miljoen mensen wereldwijd aan deze ziekte. Tegenwoordig wordt astma voornamelijk behandeld met luchtwegverwijders en ontstekingsremmers, zoals langwerkende bèta-agonisten (vb. salmeterol) en glucocorticosteroiden (vb. budesonide). Deze medicijnen kunnen de symptomen van astma (bv. kortademigheid) en de allergische ontsteking verminderen, maar behandelen niet de oorzaak (dit zijn dus echte symptoom bestrijders). Helaas hebben voornamelijk de ontstekingsremmers zoals glucocorticosteroiden verschillende bijwerkingen, zoals gewichtsverlies, verminderde groei bij kinderen en verminderde spierkracht.

Probiotica zijn micro-organismen, die indien in gepaste hoeveelheden toegediend, een positief effect kunnen hebben op de gezondheid. Voorbeelden zijn *Bifidobacterium* en *Lactobacillus* bacteriën. Uit literatuur is gebleken dat probiotica de balans tussen Th1 en Th2 kunnen verschuiven naar Th1 (astma heeft een Th2 respons) en tevens zorgt voor de productie van het anti-inflammatoire cytokine IL-10 (Shida et al., Clin Exp Allergy, 2002; Moore et al., Clin Exp Allergy, 2001).

Het is nog niet mogelijk om astma en de inductie en modulatie van het ziekteproces volledig na te bootsen door middel van alternatieve testen. Het proces is daarvoor te complex. In de afgelopen jaren zijn er diermodellen ontwikkeld waarin allergische astma bestudeerd kan worden (Heger et al., PLoS Biol., 2014; Kool et al., Immunity, 2011; Hammad et al., J Exp Med, 2010). De muizen worden allergisch gemaakt met behulp van huisstofmijt, omdat muizen geen spontane (meetbare) allergie kunnen ontwikkelen. Na sensitisatie en challenge laten de muizen manifestaties van allergische astma zien zoals we die vergelijkbaar zijn met de symptomen in patiënten. Er ontstaat een ontsteking van de longen met als belangrijkste ontstekingscel de eosinofiel granulocyt. Na een aerosol met metacholine wordt de weerstand van de longen gemeten (mate van benauwdheid). Verscheidene cytokines (zoals IL-4, IL-5 en IL-13) nemen toe in de longspoeling net zoals bij astma patiënten het geval is (Verheijden et al., Respir Res, 2015; Kool et al., Immunity, 2011; Holgate, Nat Med, 2012). Hierdoor is dit model uitermate geschikt om te kijken naar preventieve en therapeutische mogelijkheden voor het voorkomen/behandelen van allergische astma. Het onderzoeken van het werkingsmechanisme van de probiotica kan alleen in de muis doordat de allergische en astmatische reactie het gevolg is van veel type leukocyten van het immuunsysteem en specifiek in de long. De interactie van fysiologische processen in en tussen multi-cellulaire organen kan op geen enkele manier worden bestudeerd dan in het proefdier.

Er is een uitgebreide literatuur screening gedaan om vast te stellen welke experimenten al zijn uitgevoerd met probiotica in allergische astma en welke vragen nog beantwoord dienen te worden voordat de stap gemaakt kan worden naar de kliniek. Het testen van de effectiviteit van probiotica in een diermodel en het onderzoeken van het mechanisme zal hieraan bijdragen.

Voorbeelden van voedingssupplementen uit eerder onderzoek zijn: prebiotica (Verheijden et al., Resp Res, 2015) met name galacto-oligosaccharide (GOS), probiotica (Sagar et al., Resp Res 2014) en/of combinaties ervan

(Verheijden *et al.*, *Eur J Nutr*, 2015; Sagar *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 2014) en nog niet gepubliceerde resultaten uit vorige experimenten waarin we gevonden hebben dat specifieke probiotica een effect kunnen hebben op de luchtwegweerstand (mindere mate van benauwdheid) OF ontsteking van de longen, maar niet op de het remmen van beide processen. Tevens is uit literatuuronderzoek is gebleken dat verschillende *Lactobacillus* (vb. *Lactobacillus Helveticus*, *Lactobacillus Casei*, *Lactobacillus Rhamnosus* etc.) en *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium Breve*, *Bifidobacterium Bifidum* etc.) een effect kunnen hebben op luchtwegweerstand of ontsteking van de longen (Kim *et al.*, *J. Appl. Microbiol.* 2013; MacSharry *et al.*, *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 2012; Jang *et al.*, *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2012). In al deze experimenten is gebruik gemaakt van een ovalbumine geïnduceerd astma model, waarbij gebruikt wordt gemaakt van een adjuvans. Bij het huisstofmijtmodel daarentegen wordt er gebruik gemaakt van een allergeen dat gerelateerd is aan astma in de humane situatie. Tevens is in deze studies de mate van benauwdheid gemeten met behulp van de Penh meting. Deze meting staat onder discussie omdat hiermee niet de longweerstand wordt gemeten, maar veranderingen in de hoge luchtwegen (met name de neus) (Verheijden *et al.*, *Front. In Pharm.*, 2014). In dit experiment wordt gebruik gemaakt van de longweerstandmeting waarbij wel de mate van benauwdheid gemeten wordt.

Met behulp van dit project willen we door middel van verschillende (combinaties) probiotica proberen om zowel de luchtwegweerstand als ook de mate van ontsteking te remmen, combinaties van probiotica worden ook gebruikt om te onderzoeken of er hier een additieve werking van de probiotica ontstaat. Beide mechanismen zijn belangrijke parameters in astma patiënten. Tevens is de mate van ontsteking niet gerelateerd aan de mate van benauwdheid, wat dus inhoudt dat beide mechanisme los staan van elkaar. Verschillende klinische trials zijn uitgevoerd met antilichamen die gericht zijn tegen IL-5 (een belangrijke cytokine in astma). Ook hieruit is gebleken dat ze alleen effect hebben op de ontsteking en niet op de luchtwegweerstand. Daarom is het belangrijk om zowel luchtwegweerstand als ook de ontsteking te remmen.

In dit project wordt gebruik gemaakt van verschillende *Lactobacillus* bacteriën (vb. *Lactobacillus Helveticus*, *Lactobacillus Casei*, *Lactobacillus Rhamnosus* etc.) en *Bifidobacterium* bacteriën (*Bifidobacterium Breve*, *Bifidobacterium Bifidum* etc.). Uit literatuur is gebleken dat deze probiotica een effect kunnen hebben op luchtwegweerstand of ontsteking van de longen (Kim *et al.*, *J. Appl. Microbiol.* 2013; MacSharry *et al.*, *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 2012; Jang *et al.*, *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2012).

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 dit project is het onderzoeken of losse probiotica of combinaties hiervan astma symptomen kunnen onderdrukken of verminderen, dit in preventie studies en behandel studies. In het preventieve model start de behandeling met probiotica voor de sensitisatie (dus voor het eerste contact met huisstofmijt). In het behandelmodel zijn de dieren al een keer blootgesteld aan huisstofmijt (sensitisatie), waarna de behandeling met probiotica start. Door gebruik te maken van losse probiotica of combinaties hiervan willen we zowel de luchtwegweerstand (mate van benauwdheid) als de mate van ontsteking remmen in huisstofmijt allergische muizen. Combinaties van probiotica worden gebruikt om te onderzoeken of er hier een additieve werking van de probiotica ontstaat. Hierbij willen wij ook het werkingsmechanisme onderzoeken. Dit project zal fundamentele kennis opleveren die in de toekomst mogelijk kan bijdragen aan vervolgonderzoek en op lange termijn het testen van de genoemde strategie in een klinische studie. Binnen de projectduur van 2 jaar is deze doelstelling realistisch en haalbaar vanwege de uitgebreide expertise die binnen de projectgroep aanwezig is. Vanwege het voorbereidende onderzoek naar verscheidene voedingssupplementen wat voorafgaand aan dit project is uitgevoerd, wordt verwacht dat het hoofddoel haalbaar is.

3.3 Belang

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

Allergische astma is een ernstig gezondheidsprobleem wat enorm is toegenomen de afgelopen jaren. Voor allergische astma behoren corticosteroiden tot de reguliere behandeling maar deze zijn ingrijpend en kunnen bijwerkingen vertonen. Muismodellen zijn van belang voor het ophelderen van het mechanisme onderliggend aan allergische astma. Mogelijk dat dit onderzoek kan leiden tot meer inzicht in het ontstaan van allergische astma en de immunomodulatorische effecten van verschillende probiotica. Dit kan leiden tot een meer gerichte dieet-interventie. Als aangetoond kan worden dat probiotica de allergische symptomen kunnen verminderen of voorkomen zou dit gemakkelijk toegepast kunnen worden in de vorm van klinische voeding.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Binnen dit project zal onderzocht worden of probiotische voedingssupplementen de ontwikkeling van astma kunnen voorkomen en/of de ziekteverschijnselen kunnen verminderen in een huisstofmijt geïnduceerd astma model in muizen (een preventief model en een behandel model met probiotica). Naast losse probiotica zullen er ook combinaties van probiotica gebruikt worden. Dit om te onderzoeken of deze combinaties een additieve werking hebben. Door gebruik te maken van losse probiotica of combinaties hiervan willen we zowel de mate van benauwdheid als de mate van ontsteking remmen in huisstofmijt allergische muizen.

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 dit project wordt gebruik gemaakt van het al bestaande muismodel voor allergische astma (Verheijden et al., *Resp Res*, 2015). Het is nog niet mogelijk om het proces van allergische astma volledig te bootsen door middel van alternatieve testen. Het proces is daarvoor te complex. In de afgelopen jaren zijn er diermodellen ontwikkeld waarin allergie-inductie voor astma bestudeerd kan worden (Kool et al., *Immunity*, 2011; Hammad et al., *J Exp Med*, 2010). De muizen worden allergisch gemaakt met behulp van huisstofmijt, omdat de muizen geen spontane (meetbare) allergie kunnen ontwikkelen. Na sensitisatie en challenge laten de muizen echter veel, al dan niet alle manifestaties van astma zien zoals we die ook in patiënten zien. Er ontwikkelen zich ontstekingscellen (met name eosinofiele granulocyten), allergeen-specifieke T cellen, en er kan benauwdheid gemeten worden na aerosol met metacholine (Verheijden et al., *Respir Res*, 2015; Kool et al., *Immunity*, 2011). Hierdoor is dit model uitermate geschikt om te kijken naar preventie en behandel methodes in allergische astma. Het onderzoeken van het werkingsmechanisme van de probiotica kan alleen in de muis doordat het gebruik van weefsels noodzakelijk is. Muizen worden behandeld met verschillende probiotica, waarvan we willen testen of deze de ontwikkeling van astma kunnen voorkomen en/of de ziekteverschijnselen kunnen verminderen. In het preventieve model start de behandeling met probiotica voor de sensitisatie (dus voor het eerste contact met huisstofmijt). In het behandelmodel zijn de dieren al een keer blootgesteld aan huisstofmijt (sensitisatie) waarna de behandeling met probiotica start (de behandeling start dan voor de challenge met huisstofmijt). Als referentie behandeling worden de muizen behandeld met budesonide, een corticosteroid, waarvan al gebleken is uit literatuur dat deze een effect hebben op de behandeling van astma (Sagar et al., *Resp Res.*, 2014; Verheijden et al., *Resp Res*, 2015) en die ook door astmatische patiënten gebruikt wordt. Tevens maken we gebruik van een referentie probiotica. Deze referentie probiotica (*L. Rhamnosus*) wordt in de literatuur beschreven effectief te zijn in astma modellen in de muis (Wu et al., *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 2014; Kim et al., *J. Appl. Microbiol.*, 2013; Jang et al., *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2012; Sagar et al., *Respir. Res.*, 2014). Nadeel van deze studies is dat het probiotica getest is in ovalbumine astma modellen waarbij gebruikt wordt gemaakt van een adjuvans. Bij het huisstofmijtmodel daarentegen wordt er gebruik gemaakt van een allergeen dat gerelateerd is aan astma in de humane situatie. Tevens is uit de literatuur gebleken dat de *L. Rhamnosus* vaak alleen een effect heeft op ontsteking OF luchtwegweerstand. Zowel budesonide als de referentie probiotica worden gebruikt om een vergelijking te kunnen maken met de effectiviteit van de probiotica die we gaan testen. Tevens zullen we probiotica met elkaar gaan combineren en testen of deze een additieve werking hebben.

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.

Uit eerdere studies zijn een aantal werkzame probiotica geselecteerd. Deze probiotica hadden effect op ontsteking of luchtwegweerstand. In de huidige

studie worden deze losse probiotica en combinaties hiervan gemaakt om te testen of deze mogelijk een additieve werking hebben. De probiotica zullen getest worden in een preventief en een behandel model. Inzicht in specifieke veranderingen die optreden op immunologisch niveau levert wetenschappelijke kennis op die in de toekomst een bijdrage zou kunnen leveren aan vervolgonderzoek en aan het testen van de strategie in een klinische studie.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Huisstofmijt geïnduceerd model voor allergische astma
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.	10800				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Huisstofmijt geïnduceerd model voor allergische astma</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Huisstofmijt geïnduceerd model voor allergische astma
Volgnummer	Type dierproef					
1	Huisstofmijt geïnduceerd model voor allergische astma					

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Om de doelstelling van deze projectaanvraag te bereiken zullen wij gebruik maken van het al ontwikkelde muismodel voor huisstofmijt allergische astma (Verheijden et al., *European Journal of Nutrition* 2015; Verheijden et al., *Respiratory Research*, 2015). In dit model worden muizen intranasaal gesensitiseerd met huisstofmijt of PBS en intranasaal gechallenged met huisstofmijt of PBS. Met behulp van het huisstofmijt model in de muis kunnen wij onderzoeken welk type behandeling het meest geschikt is om de acute allergische response te voorkomen/verminderen en/of lange termijn bescherming tegen de allergie te bevorderen. Om de effectiviteit en de veiligheid te bepalen zal gebruik gemaakt worden van klinische parameters om de mate van de allergische response vast te stellen. Voorbeeld hiervan is de luchtwegfunctie (weerstand) meting na toediening van methacholine. Methacholine is een stof

waardoor de longen samentrekken. De verneveling van methacholine wordt ook gebruikt in de kliniek (de provocatie test). Om te onderzoeken wat er mechanistisch gebeurt, zullen wij naast klinische parameters ook kijken naar cellulaire en humorale parameters die we meten in de broncho-alveolaire lavage (BAL, longspoeling) en organen. Het aantal ontstekingscellen in de BAL wordt geteld, met als belangrijkste celtype de eosinofiel (*Verheijden et al., European Journal of Nutrition 2015; Verheijden et al., Respiratory Research, 2015*). In dit experiment worden dieren behandeld met budesonide (1), probiotica (2), referentie probiotica (3).

- (1) Budesonide is een corticosteroid wat behoort tot de voorgeschreven medicamenten in astma patiënten. De dieren worden intratracheaal (oropharyngeally) behandeld met budesonide. Op de dagen waarop ook huisstofmijt challenge plaatsvindt, 6 uur voor de challenge. Uit eerdere studies is gebleken dat budesonide luchtwegweerstand (benauwdheid) en eosinofiele influx in huisstofmijt allergische muizen kan verlagen. (data verkregen uit eerdere experimenten)
- (2) Probiotica interventie; probiotica zijn van nature voorkomende bacteriën in de darm die een gunstige invloed hebben op onze afweer. De dieren worden vanaf dag -1 tot het eind van het experiment (dag 14) oraal (gavage) behandeld met verschillende soorten probiotica (preventie studie) of start voor challenge, maar na sensitisatie (behandel studie). Door middel van behandeling met probiotica wordt verwacht dat de mate van ontsteking en benauwdheid in mindere mate aanwezig zullen zijn. De keuze van de **probiotica** is gebaseerd op eerder in-vitro en in-vivo onderzoek waaruit gebleken is dat deze **probiotica** de cytokine productie verminderen (in-vitro) en ontsteking of mate van benauwdheid verminderen (in-vivo).
- (3) Referentie **probioticum** (*L. Rhamnosus*); van deze **probioticum** is uit de literatuur gebleken dat deze effect heeft in allergische astma modellen in de muis (met name verlaging van ontsteking of mate van benauwdheid) (*Wu et al., J. Microbiol. Immunol. Infect., 2014; Kim et al., J. Appl. Microbiol., 2013; Jang et al., Allergy Asthma Immunol. Res., 2012; Sagar et al., Respir. Res., 2014*). Deze wordt dan ook gebruikt om de werking van de nieuwe probiotica mee te vergelijken. De dieren worden vanaf dag -1 tot het eind van het experiment (dag 14) oraal (gavage) behandeld met het referentie **probioticum** (preventie studie) of start voor challenge, maar na sensitisatie (behandel studie).
- (4) Combinaties van probiotica; **Probiotica** kunnen ontsteking en mate van benauwdheid remmen in een astmatisch muizen model. Door probiotica te combineren willen we kijken of het effect vergroot kan worden. De dieren worden vanaf dag -1 tot het eind van het experiment (dag 14) oraal (gavage) behandeld met combinaties van probiotica (preventie studie) of start voor challenge, maar na sensitisatie (behandel studie). In eerdere studies die uitgevoerd zijn, zien we dat enkele probioticum een effect hebben op ontsteking en andere een effect op het verbeteren van de longfunctie.

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 intranasaal gesensitiseerd (1x) met PBS (negatieve controle) of huisstofmijt (positieve controle). Gedurende 5 dagen, 1 maal per dag worden de dieren gechallenged met PBS (negatieve controle) of huisstofmijt (positieve controle). Sensitisatie en challenge vinden beide plaats onder isofluraan anesthesie (totaal 6x, 3 min per keer).

Negatieve controle dieren worden gesensitiseerd en gechallenged met PBS; positieve controle dieren worden gesensitiseerd en gechallenged met huisstofmijt. Dieren worden 4x intratracheaal (oropharyngeally) behandeld met budesonide, onder isofluraan anesthesie (totaal 4x, 3 min per keer). Op dagen waarop de huisstofmijt challenge plaatsvindt, worden de dieren 6 uur voor de challenge behandeld met budesonide. Probiotica (losse probiotica, referentie probiotica of combinaties van probiotica) behandeling (oraal) vindt plaats vanaf dag -1 tot het eind van het experiment (preventie studie) of na sensitisatie, maar voor

challenge (behandel studie), 3 maal per week (1 min per keer). Op dag 14 wordt de luchtwegweerstand gemeten, na metacholine toediening, onder terminale anesthesie. Indien gewenst kan op bepaalde tijdstippen tijdens het experiment bloed worden afgenomen en feces monsters worden verzameld. De dieren worden tijdens de feces verzameling voor korte periode apart gehuisvest.

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

Om zo betrouwbaar mogelijke resultaten uit dit type dierproef te verkrijgen wordt altijd gebruik gemaakt van de juiste controle en behandelgroepen. Negatieve controle dieren worden gesensitiseerd en gechallenged met PBS; positieve controle dieren worden gesensitiseerd en gechallenged met huisstofmijt. Het gekozen aantal groepen is wat minimaal nodig is om de juiste vergelijkingen te kunnen maken en om betrouwbare resultaten te krijgen. De groeps grootte wordt bepaald aan de hand van een relevante parameter. Per experiment kan bepaald worden welke parameter het meest relevant is. Hier kan bijvoorbeeld gekozen worden voor luchtwegweerstand of eosinofiele cel telling.

Aan de hand van eerdere experimenten met een vergelijkbare opzet kunnen we berekenen wat het window van effect en de variatie is voor de gekozen parameter. We baseren de groeps grootte dus op de aantallen die uit de powerberekening komen. Ter verduidelijking een voorbeeld studie met bijbehorende groepsindeling (PB: probiotica; HDM: huisstofmijt):

- A n=9 PBS sensitisatie --- PBS challenge (NEGATIEVE CONTROLE)
- B n=9 HDM sensitisatie --- HDM challenge (POSITIEVE CONTROLE)
- C n=9 HDM sensitisatie --- HDM challenge + Budesonide
- D n= n=9 HDM sensitisatie --- HDM challenge + referentie PB
- E n= n=9 HDM sensitisatie --- HDM challenge + PB1
- F n=9 HDM sensitisatie --- HDM challenge + PB2
- G n=9 HDM sensitisatie --- HDM challenge + PB1 + PB2

Naar analogie van eerdere aanwijzingen van statistiek afdeling hebben we een poweranalyse uitgevoerd op voor dit onderzoek constante en belangrijke parameters. Het gaat hier om een continue uitkomst. Hieronder zal de berekening worden weergegeven.

1. Continue uitkomst – Luchtwegweerstand

In het proefdiermodel staat de luchtwegfunctie centraal en wordt er gekeken naar een aantal parameters (in dit punt luchtwegweerstand) daarin op dag 14. De dieren worden daarbij blootgesteld aan oplopende doseringen methacholine, die per aerosol toegediend worden. Bij validatie van het model zijn de volgende resultaten (cm H₂O/ml/sec) naar voren gekomen:

Huisstofmijt-gesensibiliseerde en PBS gechallengde muizen (controle groep): 2.78 ± 1.26 (sd)

Huisstofmijt-gesensibiliseerde en huisstofmijt gechallengde muizen (experimentele groep): 4.60 ± 1.41 (sd)

δ = verschil tussen beide gemiddelde waarden = $|4.60 - 2.78| = 1.82$

σ = sd hdm = 1.41

formule: $n \geq \frac{2\sigma^2}{\delta^2} \cdot (1.96 + 0.842)^2 = 9$ muizen/groep

B. De dieren

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

Het type diersoort dat zal worden gebruikt in het allergisch astma model is de muis, de BALB/c By JiCo stam. De herkomst van de muizen is een geregistreerd fokbedrijf. Muizen zijn geschikte proefdieren voor immunologisch onderzoek, omdat veel methoden en producten voorhanden zijn om het functioneren van het immuunsysteem te bepalen. De BALB/c muis die wij gebruiken is gevoelig voor de inductie van allergische astma (*Hammad et al., Journal of Experimental Medicine, 2010; Verheijden et al., 2015, Respiratory Research*).

Dit model is gevalideerd in mannelijke muizen. We kunnen geen combinatie van mannelijke en vrouwelijke muizen gebruiken omdat dit zal leiden tot een grotere spreiding waardoor er meer dieren nodig zijn om statistisch significante verschillen aan te tonen tussen de verschillende behandelgroepen. Tevens hebben wij in een eerdere studie aangetoond dat onze belangrijkste parameter (luchtwegweerstand) geen verschillen oplevert in vrouwelijke muizen en wel in mannelijke muizen (zie figuur bijlage). Bovengenoemde bevindingen en onze ervaringen binnen onze afdeling (validatie model in mannen en bijbehorende poweranalyses) liggen ten grondslag aan de keuze voor mannelijke muizen.

Het aantal dieren dat wij verwachten te gebruiken binnen het allergisch astma model is 756 over een periode van 2 jaar.

Naar verwachting zullen we de probiotica los van elkaar en in combinatie met elkaar testen in een preventie studie en behandel studie, met als controle behandeling: budesonide en een referentie probioticum (*L. Rhamnosus*). In het preventieve model start de behandeling met probiotica voor de sensitisatie (dus voor het eerste contact met huisstofmijt). In het behandelmodel zijn de dieren al een keer blootgesteld aan huisstofmijt (sensitisatie), waarna de behandeling met probiotica start.

Per experiment zullen er ongeveer 63 muizen nodig zijn om alle controle- en behandelgroepen mee te kunnen nemen. Op basis van eerder onderzoek, literatuurstudie, doses probiotica en verschillende tijdstippen van interventie komt dit uit op 12 studies x 63 muizen per studie = 756 muizen voor dit type experiment.

Bij elk experiment zijn standaard de volgende groepen inbegrepen:

Positieve controle

Negatieve controle

Budesonide groep

Referentie probioticum groep

Daarnaast worden er maximaal 6 verschillende probioticum getest, los van elkaar of in combinaties van 2 of 3. Enkele voorbeelden van probioticum die gebruikt worden zijn *Lactobacillus Helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium Bifidum*, *Bifidobacterium Longum* etc.

Voorbeelden van studies:

1	3	1	1	2	2	1
2	4	3	4	3	4	2
1+2	3+4	1+3	1+4	2+3	2+4	3
						1+2+3

Etc.

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 welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

De experimentele strategie beschreven bij punt A is opgesteld met in acht neming van de methodes om vervanging, vermindering en verfijning toe te passen.

Vervanging: Het huisstofmijt allergisch astma model is ontworpen om de ontwikkeling en modulatie van astma te kunnen onderzoeken en vanwege de complexiteit is het niet mogelijk dit volledig in vitro na te bootsen. Om het effect van een dieetinterventie met probiotica te onderzoeken hebben wij een compleet organisme nodig.

Vermindering: Het aantal diergroepen per experiment wordt beperkt door alleen de meest noodzakelijke experimentele- en controle groepen te kiezen. Op deze manier kunnen we de juiste vergelijkingen maken zodat we optimale uitkomsten kunnen behalen, maar beperken we het aantal groepen. Per groep wordt het minimaal noodzakelijke aantal dieren berekend aan de hand van een powerberekening. Deze berekening wordt gebaseerd op een parameter waar in het verleden duidelijke resultaten mee zijn behaald (zie uitleg punt A). Door vooraf te bepalen wanneer een effect relevant is en wat de verwachte spreiding is binnen de groep, kunnen we de groepsgrootte exact berekenen.

Verfijning: De keuze om deze muissoort te gebruiken binnen deze proefopzet is onderbouwd bij punt B en daarnaast hebben wij de mate van ongerief binnen het model zo veel mogelijk beperkt door kennis uit eerdere (pilot) experimenten te gebruiken wat betreft huisstofmijt sensitisatie en challenge dosering en budesonide behandeling. Het eventuele ongerief wat kan optreden kunnen we zoveel mogelijk beperken, maar niet voorkomen. Het ongerief wordt zo veel mogelijk beperkt door de behandelingen zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren door ervaren medewerkers.

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.

Muizen worden gehuisvest in een gespecialiseerde dierfaciliteit en verzorgd door gecertificeerd personeel. Muizen worden in groepen gehuisvest in kooien met standaard bedding en kooiverrijking. Tijdens het experiment hebben de muizen onbeperkt toegang tot water en voedsel. Aangezien het welzijn zou kunnen worden aangetast door stress, wordt ernaar gestreefd de behandelingen zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren bij de dieren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt. Wanneer een dier onverwacht ernstig ongerief ondervindt wordt besloten het dier te doden.

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?

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Stress

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Vanwege de frequentie van behandeling en anesthesie, kunnen de dieren stress ervaren.

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

Om stress zoveel mogelijk te beperken wordt ernaar gestreefd de behandeling zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren bij de individuele dieren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak tot een minimum wordt beperkt.

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.

Bij dit experiment worden geen omstandigheden verwacht waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd worden, dit omdat de muizen geen symptomen van allergie ondervinden na sensitisatie en challenge.

Tijdens de dagelijkse controle door de diervverzorgers en de reguliere controles door de projectleden zullen acties ondernomen worden wanneer hoog uitzonderlijke abnormaliteiten zoals abnormaal gedrag, beweging, ernstig gewichtsverlies of wondjes waargenomen worden. In dit geval zal er actie ondernomen worden door eventueel het dier individueel te huisvesten en/of er wordt contact opgenomen met de diervverzorgers en/of de

proefdierdeskundige om te kijken of het dier uit het experiment gehaald moet worden om onnodig ongerief te voorkomen.

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.

Positieve controle groep en negatieve controle groep:

6x anesthesie (isofluraan, 3 min per keer) voor sensitisatie en challenge inclusief bijkomen → **matig ongerief**

Budesonide groep:

6x anesthesie (isofluraan, 3 min per keer) voor sensitisatie en challenge inclusief bijkomen → **matig ongerief**

budesonide behandeling 4x anesthesie (isofluraan, 3 min per keer) → **matig ongerief**

Probiotica groepen:

6x anesthesie (isofluraan, 3 min per keer) voor sensitisatie en challenge inclusief bijkomen → **matig ongerief**

Probiotica behandeling d.m.v. gavage → **licht ongerief**

De luchtwegfunctiemeting inclusief metacholine aerosol vindt plaats onder terminale anesthesie en levert geen bijdrage aan het totaal ondervonden ongerief.

Hierdoor zal het ongerief van alle dieren binnen het huisstofmijt allergische model worden geclassificeerd als **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.

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

De dieren die worden gebruikt in dit type dierexperiment zullen na afloop van het experiment worden gedood vanwege de noodzaak om organen en bloed te verzamelen voor verdere analyse in het laboratorium.

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2015.II.858.036
2. Titel van het project : "Effecten van probiotica-stammen in een muismodel voor allergische astma"
3. Titel van de NTS : Het effect van gezondheidsbevorderende bacteriën op allergische astma

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: 10-09-2015
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 30-09-2015 en 21-10-2015
 anderszins behandeld: per mail: 04-11-2015
 termijnonderbreking(en) van / tot : 05-10-2015 tot 09-10-2015
23-10-2015 tot 04-11-2015
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 17-12-2015

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: 05-10-2015
- Strekking van de vragen:

Niet Technische Samenvatting

- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: De DEC adviseert u om aan de eerste zin toe te voegen: 'In dit project willen we ... of ze allergie kunnen verminderen of voorkomen...!'.
- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: Tevens adviseert de DEC u om de laatste zin te formuleren als volgt: '... die effect heeft op zowel de mate van benauwdheid als ook op de mate van ontsteking.' Dat geeft beter weer dat het juist om de combinatie gaat.
- 3.4 Verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdierendieren: De DEC is van mening dat de toelichting hier wat summier is en verzoekt u ook in te gaan op ongerief dat voortkomt uit benauwdheid, anesthesie, longfunctiemetingen, etc.

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: Hetgeen al bekend is over effecten van probiotica op luchtweg allergie uit de literatuur en uit eigen onderzoek is buitengewoon summier opgeschreven. Het is de DEC niet duidelijk wat er nog niet bekend is c.q. wat dit onderzoek toevoegt aan hetgeen al bekend is. De DEC verzoekt u deze informatie alsnog op te nemen in het projectvoorstel.
- 3.1 Achtergrond: De DEC wil graag inzage in de te testen stammen. Het is voor de DEC nu niet mogelijk om een goede afweging te maken. Indien de probiotica stammen die u gebruikt geheim zijn vragen wij u deze voor te leggen aan een door de DEC te vragen expert op dit gebied. De expert zal de DEC vervolgens adviseren zonder de geheime informatie met de DEC te delen.
- 3.1 Achtergrond: De DEC verzoekt u de termen inflammatie en reactiviteit beter te definiëren en aan te geven wat het verband c.q. het verschil is. Het lijkt erop dat u op zoek bent naar probiotica die beide mechanismen beïnvloeden, alleen of in combinatie. Dit moet helder in de hypothese worden opgenomen.
- 3.2 Doel: U dient zich hier te beperken tot het doel. Tekst over de reeds behaalde resultaten moet naar 3.1 achtergrond, evenals de literatuurgegevens.
- 3.2 Doel: Het doel graag duidelijker beschrijven.
- 3.2 Doel: U gebruikt hier de term 'preklinisch', wat verwarrend is want dit lijkt hier niet aan de orde. Graag verwijderen.
- 3.2 Doel/3.4 Onderzoeksstrategie: U beschrijft indirect wat de hypothese is, namelijk dat de door u gekozen (combinatie van) probiotica effectief zal zijn, omdat deze effect hebben op zowel luchtwegreactiviteit als ook op ontsteking van de longen. Dat zou meer expliciet en uitgebreid bij het doel (en eigenlijk ook al in de achtergrond) opgenomen moeten worden. Graag alsnog doen.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC mist hier de criteria waarbij u het besluit neemt om in muismodel voor allergische astma te gaan onderzoeken. Met andere woorden: de inclusiecriteria ontbreken. Graag alsnog opnemen.

Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De onderbouwing voor de benodigde aantallen dieren is onvoldoende. De N=9 graag nader onderbouwen.
- B. De dieren: In twee jaar worden 12 proeven gedaan, elk met 63 dieren. Betekent dat 36 verschillende probiotica? Graag verhelderen.
- B. De dieren: De DEC verzoekt u het gebruik van uitsluitend mannelijke dieren beter te motiveren.
- B. De dieren: Op p.3, onderste alinea staat: 'Naar verwachting zullen we probiotische stammen los van elkaar en in combinatie van elkaar testen (preventie en behandelstudie).' Deze zin is wat verwarrend. Of iets een preventie- of behandelstudie is wordt bepaald door het tijdstip van interventie, en niet door de in te zetten probiotica. De zin daarom graag wijzigen.
- D. Vervanging, vermindering en verfijning: Onder verfijning staat de zin 'Het eventuele ongerief wat kan optreden kunnen we zoveel mogelijk beperken, maar niet voorkomen'. Hier graag ook aangeven hoe u het ongerief zoveel mogelijk gaat beperken.
- I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen: Hier geeft u aan dat u alleen stress voorziet als eventuele andere vorm van welzijnsaantasting. De DEC vraagt zich af of u niet ook benauwdheid verwacht?
- J. Humane eindpunten: De humane eindpunten zijn niet ingevuld. Graag alsnog doen.
- K. Classificatie van ongerief: U geeft aan dat alle dieren matig ongerief ervaren. De DEC kan zich voorstellen dat de dieren uit de controlegroep (budesonide-behandeling) door 4x extra anesthesie uiteindelijk ook uitkomen op matig ongerief, maar ziet echter wel graag dat het cumulatieve ongerief voor de controle en experimentele groepen afzonderlijk en duidelijker opgeschreven wordt.

Algemeen

- De DEC adviseert u contact op te nemen met de IvD voor een betere afstemming van, met name, bijlage 1. Daarnaast wordt in het projectvoorstel probioticum (enkelvoud) en probiotica (meervoud) door elkaar gebruikt. Graag corrigeren.
- Datum antwoord: 09-10-2015
- Strekking van de antwoorden:

Niet Technische Samenvatting

- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: Deze zin is aangepast in de niet technische samenvatting.
- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: Deze zin is aangepast in de niet technische samenvatting.
- 3.4 Verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren: De verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zijn: Het toedienen van huisstofmijt, PBS en luchtwegverwijder. Dit vindt plaats onder anesthesie, hier kunnen de dieren ongerief van ondervinden. Tevens zullen de muizen licht ongerief ervaren tijdens het vastpakken en

tijdens het toedienen van de probiotica. Muizen hebben geen last van benauwdheid na challenge met huisstofmijt. Alleen tijdens de luchtwegfunctiemeting wordt benauwdheid gemeten, omdat er een prikkel wordt gegeven waardoor de spieren in de luchtwegen samentrekken, maar hierbij zijn de dieren onder anesthesie. De hoeveelheid behandelingen kan wel stress veroorzaken. De dieren ondervinden geen blijvende effecten van een allergische reactie.

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: De effecten van probiotica op astma waren inderdaad summier opgeschreven. Daarom hebben we geprobeerd om deze uitgebreider te omschrijven inclusief de toevoegende waarde van dit onderzoek. Uit literatuuronderzoek is gebleken dat Lactobacillus stammen (vb. Helveticus, Casei, Rhamnosus etc.) en Bifidobacterium stammen (Breve, Bifidum etc.) een effect kunnen hebben op luchtwegweerstand of ontsteking van de longen (Kim et al., J. Appl. Microbiol. 2013; MacSharry et al., Pulm. Pharmacol. Ther., 2012; Jang et al., Allergy Asthma Immunol. Res., 2012). In al deze experimenten is gebruik gemaakt van een ovalbumine geïnduceerd astma model, waarbij gebruikt wordt gemaakt van een adjuvans. Bij het huisstofmijtmodel daarentegen wordt er gebruik gemaakt van een allergeen dat gerelateerd is aan astma in de humane situatie. Tevens is in deze studies de mate van benauwdheid gemeten met behulp van de Penh meting. Deze meting staat onder discussie omdat hiermee niet de longweerstand wordt gemeten, maar veranderingen in de hoge luchtwegen (met name de neus) (Verheijden et al., Front. In Pharm., 2014). In dit experiment wordt gebruik gemaakt van de longweerstandmeting waarbij wel de mate van benauwdheid gemeten wordt. Door in dit experiment nieuwe losse probiotica stammen of combinaties hiervan te testen willen we zowel de mate van benauwdheid als ook de mate van ontsteking remmen. Mogelijk zorgen combinatie van probiotica stammen voor een additieve werking op deze parameters.
- 3.1 Achtergrond: De te testen stammen zijn niet geheim. In dit project wordt gebruik gemaakt van verschillende Lactobacillus stammen (vb. Helveticus, Casei, Rhamnosus etc.) en Bifidobacterium stammen (Breve, Bifidum, Longum etc.).
- 3.1 Achtergrond: We begrijpen dat de termen inflammatie en reactiviteit niet helemaal duidelijk zijn en hebben deze daarom aangepast in ontsteking en luchtwegweerstand in de gehele aanvraag. Na sensitisatie en challenge laten de muizen manifestaties van allergische astma zien zoals die vergelijkbaar zijn met de symptomen in patiënten. Er ontstaat een inflammatie (ontsteking) van de longen met als belangrijkste ontstekingscel de eosinofiele granulocyt. Deze cellen worden geteld na spoeling van de longen. Na een aerosol met metacholine wordt de weerstand van de longen gemeten (mate van benauwdheid). Verscheidene cytokines (zoals IL-4, IL-5 en IL-13) nemen toe in de longspoeling net zoals bij astmapatiënten het geval is (Verheijden et al., Respir Res, 2015; Kool et al., Immunity, 2011; Holgate, Nat Med, 2012). Met behulp van dit project willen we door middel van verschillende (combinaties) probiotica stammen proberen om zowel de luchtwegweerstand als ook de mate van ontsteking te remmen. Beide mechanismen zijn belangrijke parameters in

astmapatiënten. Tevens is de mate van ontsteking niet gerelateerd aan de mate van benauwdheid, wat dus inhoudt dat beide mechanisme los staan van elkaar. Verschillende klinische trials zijn uitgevoerd met antilichamen die gericht zijn tegen IL-5 (een belangrijke cytokine in astma). Ook hieruit is gebleken dat ze alleen effect hebben op de ontsteking en niet op de luchtwegweerstand (Leckie et al., Lancet, 2000; Flood-Page et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2007). Daarom is het belangrijk om zowel luchtwegweerstand als ook de ontsteking te remmen.

- 3.2 Doel: Is verplaatst naar 3.1 achtergrond.
- 3.2 Doel: Het hoofddoel van dit project is het onderzoeken of losse probiotica stammen of combinaties hiervan astmasymptomen kunnen onderdrukken of verminderen, dit in preventie studies en behandel studies. In het preventieve model start de behandeling met probiotica voor de sensitisatie (dus voor het eerste contact met huisstofmijt). In het behandelmodel zijn de dieren al een keer blootgesteld aan huisstofmijt (sensitisatie), waarna de behandeling met probiotica start. Door gebruik te maken van losse probiotica of combinaties hiervan willen we zowel de luchtwegweerstand (mate van benauwdheid) als de mate van ontsteking remmen in huisstofmijt allergische muizen. Combinaties van probiotica stammen worden gebruikt om te onderzoeken of er hier een additieve werking van de probiotica stammen ontstaat.
- 3.2 Doel: Is aangepast.
- 3.2 Doel/3.4 Onderzoeksstrategie: De hypothese is in zowel het doel en de achtergrond explicieter beschreven.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: Het is onderzoeker niet helemaal duidelijk wat de DEC hier bedoelt. We gaan ervan uit dat de DEC vraagt waarom we een muismodel gebruiken voor allergisch astma. Het is nog niet mogelijk om het proces van allergische astma volledig te bootsen door middel van alternatieve testen. Het proces is daarvoor te complex. In de afgelopen jaren zijn er diermodellen ontwikkeld waarin allergie inductie voor astma bestudeerd kan worden (Kool et al., Immunity, 2011; Hammad et al., J Exp Med, 2010). De muizen worden allergisch gemaakt met behulp van huisstofmijt, omdat de muizen geen spontane (meetbare) allergie kunnen ontwikkelen. Na sensitisatie en challenge laten de muizen echter veel, al dan niet alle manifestaties van astma zien zoals we die ook in patiënten zien. Er ontwikkelen zich ontstekingscellen (met name eosinofiele granulocyten), allergeen-specifieke T cellen, en er kan benauwdheid gemeten worden na aerosol met metacholine (Verheijden et al., Respir Res, 2015; Kool et al., Immunity, 2011). Hierdoor is dit model uitermate geschikt om te kijken naar preventie en behandel methodes in allergische astma. Het onderzoeken van het werkingsmechanisme van de probiotica kan alleen in de muis doordat het gebruik van weefsels noodzakelijk is.

Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Naar analogie van eerdere aanwijzingen van de statistiek afdeling hebben we een poweranalyse uitgevoerd op voor dit onderzoek constante en belangrijke parameters. De powerberekening is opgenomen in de aanvraag bij punt A van bijlage 1.

- B. De dieren: Bij elk experiment zijn standaard de volgende groepen inbegrepen: 1) positieve controle, 2) negatieve controle, 3) Budesonide groep, en 4) referentie probiotica groep. Daarnaast worden er maximaal 6 verschillende stammen getest, los van elkaar of in combinaties van 2 of 3 stammen. Enkele stammen die gebruikt worden zijn Lactobacillus Helveticus, Lactobacillus Casei, Bifidobacterium Bifidum, Bifidobacterium Longum etc.

Voorbeelden van studies:

1	3	1	1	2	2	1
2	4	3	4	3	4	2
1+2	3+4	1+3	1+4	2+3	2+4	3
						1+2+3

- B. De dieren: Wanneer in studies gebruik gemaakt wordt van zowel mannelijke als vrouwelijke muizen zal dit leiden tot een grotere spreiding en zijn er meer dieren nodig om statistisch significante verschillen aan te tonen tussen de verschillende behandelgroepen. Indien de DEC de voorkeur geeft aan vrouwelijk muizen, dan zal eerst een experiment uitgevoerd moeten worden om het model te valideren in vrouwelijke muizen. Deze vergelijkende studie brengt het gebruik van extra proefdieren met zich mee. Het belangrijkste argument voor de onderzoekers is dat de vergelijking tussen geslachten niet het doel is van deze studie. Voor translatie zal dit uiteindelijk in de toekomst wel relevant zijn, maar dit valt buiten de onderzoeksvraag. Bovengenoemde bevindingen en onze ervaringen binnen onze afdeling (validatie model in mannen en bijbehorende poweranalyses) liggen ten grondslag aan de keuze voor mannelijke muizen.
- B. De dieren: Deze zin is aangepast in: Naar verwachting zullen we probiotische stammen los van elkaar en in combinatie met elkaar testen in een preventie studie en behandel studie, met als controle behandeling: budesonide en een referentie probiotica (L. Rhamnosus). In het preventieve model start de behandeling met probiotica voor de sensitatisatie (dus voor het eerste contact met huisstofmijt). In het behandelmodel zijn de dieren al een keer blootgesteld aan huisstofmijt (sensitatisatie), waarna de behandeling met probiotica start.
- D. Vervanging, vermindering en verfijning: Het ongerief wordt zo veel mogelijk beperkt door de behandelingen zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren door ervaren medewerkers.
- I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen: Na sensitatisatie en challenge vertonen de muizen geen benauwdheid. Alleen tijdens de luchtwegfunctiemeting wordt benauwdheid gemeten. Dit wordt dan geïnduceerd door een aerosol te geven met metacholine. Hierdoor trekken de spieren van de luchtwegen samen, omdat de dieren hierbij onder anesthesie zijn zullen ze hier geen ongerief van ondervinden.
- J. Humane eindpunten: De humane eindpunten zijn ingevuld onder punt J. Bij dit experiment worden geen omstandigheden verwacht waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd worden, omdat de muizen geen symptomen van allergie ondervinden na sensitatisatie en challenge. Tijdens de dagelijkse controle door de diervverzorgers en de reguliere controles door de projectleden zullen acties ondernomen worden wanneer hoog uitzonderlijke abnormaliteiten zoals abnormaal gedrag, beweging, ernstig gewichtsverlies of wondjes waargenomen worden. In dit geval zal er actie ondernomen worden door eventueel het dier individueel te huisvesten en/of er wordt contact opgenomen met de diervverzorgers

en/of de proefdierdeskundige om te kijken of het dier uit het experiment gehaald moet worden om onnodig ongerief te voorkomen.

- K. Classificatie van ongerief: Het ongerief is nu voor alle groepen afzonderlijk beschreven.

Algemeen

- Dit is aangepast.

- Datum: 23-10-2015
- Strekking van de vragen:
 - Bijlage 1, punt B: U heeft hier onvoldoende beargumenteerd waarom u geen vrouwelijk dieren kunt gebruiken. Of u wijzigt uw opzet of u zet uw argumentatie krachtiger uiteen.
 - Bijlage 1, pagina 4, Onderbouwing aantallen dieren: Belangrijk is om aan te geven hoeveel dieren u nodig heeft om uw onderzoeksvraag te beantwoorden; u kunt het aantal dieren niet relateren aan de hoeveel tijd die u heeft voor het uitvoeren van uw onderzoek (2 jaar).
 - Bijlage 1, algemeen: De DEC verzoekt u waar nodig de juiste nomenclatuur te gebruiken voor wat betreft de species en stammen.

- Datum antwoord: 04-11-2015
- Strekking van de antwoorden:
 - Bijlage 1, punt B: Het type diersoort dat zal worden gebruikt in het allergisch astma model is de muis, de BALB/c By JiCo stam. De herkomst van de muizen is een geregistreerd fokbedrijf. Muizen zijn geschikte proefdieren voor immunologisch onderzoek, omdat veel methoden en producten voorhanden zijn om het functioneren van het immuunsysteem te bepalen. De BALB/c muis die wij gebruiken is gevoelig voor de inductie van allergische astma (Hammad et al., Journal of Experimental Medicine, 2010; Verheijden et al., 2015, Respiratory Research). Dit model is gevalideerd in mannelijke muizen. We kunnen geen combinatie van mannelijke en vrouwelijke muizen gebruiken omdat dit zal leiden tot een grotere spreiding waardoor er meer dieren nodig zijn om statistisch significante verschillen aan te tonen tussen de verschillende behandelgroepen. Tevens hebben wij in een eerdere studie aangetoond dat onze belangrijkste parameter (luchtwegweerstand) geen verschillen oplevert in vrouwelijke muizen en wel in mannelijke muizen (zie figuur bijlage). Bovengenoemde bevindingen en onze ervaringen binnen onze afdeling (validatie model in mannen en bijbehorende poweranalyses) liggen ten grondslag aan de keuze voor mannelijke muizen.

Luchtwegweersand

Pbs VROUW

HDM VROUW

Budesonide VROUW

Pbs MAN

HDM MAN

Budesonide MAN

- Bijlage 1, pagina 4, Onderbouwing aantallen dieren: Dit is aangepast in: 12 studies x 63 muizen per studie = 756 muizen voor dit type experiment
- Bijlage 1, algemeen: Is aangepast.
- 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. Allergisch astma is een steeds meer voorkomende chronische aandoening van de luchtwegen die grote invloed kan hebben op het dagelijks leven van patiënten. Tot op heden kan deze aandoening slechts symptomatisch behandeld worden met luchtwegverwijders en ontstekingsremmers, waarbij met name de ontstekingsremmers verschillende bijwerkingen hebben. Er zijn aanwijzingen dat probiotica dankzij hun immuunmodulerende werking een gunstig effect kunnen hebben op belangrijke symptomen van astma. De aanvrager wil met behulp van het voorliggende project nader onderzoeken óf en op welke wijze probiotica de ontwikkeling van astma kunnen voorkomen en/of de symptomen kunnen verminderen. Het project zal fundamentele kennis opleveren over de onderliggende mechanismen van allergisch astma en de immuunmodulerende effecten van verschillende probiotica. Daarmee kan het project op de lange termijn bijdragen aan de ontwikkeling van probiotische voedingssupplementen ter preventieve en/of behandeling van allergisch astma. Het belang van de doelstelling schat de DEC daarom in als substantieel.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. In dit project worden de effecten van verschillende probiotica in een huisstofmijt-geïnduceerd model voor allergisch astma onderzocht (bijlage 1). De keuze voor de te testen probiotica is gebaseerd op resultaten uit eerder *in vitro* en *in vivo* onderzoek. In de *in vivo* studies hadden de probiotica een gunstig effect op ófwel de luchtwegweerstand ófwel de ontsteking van de luchtwegen. Om te onderzoeken of de geselecteerde probiotica ook een additieve werking kunnen hebben – zowel op de luchtwegweerstand als op de mate van ontsteking – worden de probiotica in dit project op zichzelf staand en gecombineerd toegediend. Ook zullen zij zowel in een preventieve als in een curatieve setting onderzocht worden. 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 bijlage 1 zullen alle dieren van alle experimentele groepen matig ongerief ondervinden, omdat ze herhaaldelijk onder anesthesie gebracht worden (voor sensitisatie en challenge met PBS of huisstofmijt) teneinde allergisch astma te induceren. Toediening van probiotica door middel van orale gavage veroorzaakt licht ongerief.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. De interacties tussen verschillende weefsels en celtypen die een rol spelen bij allergisch astma – en de effecten van een dieetinterventie hierop – zijn dusdanig complex, dat deze niet in hun volledigheid *in vitro* of *in silico* nagebootst kunnen worden. In verband met de opzet van het onderzoek (inductie van allergisch astma om preventieve effecten te kunnen beoordelen) en de aard van de benodigde gegevens (onder andere analyse van cellulaire en humorale parameters in verschillende organen) is het niet mogelijk om het onderzoek uit te voeren in mensen. *In vivo* experimenten met proefdieren zijn dus noodzakelijk.
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. Met behulp van gegevens uit voorgaande studies (onder andere uitgevoerd ter validatie van het beschreven muismodel) worden powerberekeningen uitgevoerd, zodat het optimale aantal dieren per groep vooraf bepaald kan worden. Om onnodig proefdiergebruik te voorkomen worden alleen de meest noodzakelijke experimentele- en controlegroepen meegenomen in het onderzoek.
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 muis is gekozen als modeldier, omdat het immuunsysteem goed in kaart gebracht is en veel overeenkomsten vertoont met het immuunsysteem van de mens. Bovendien zijn veel methoden en producten voorhanden waarmee men het functioneren van het immuunsysteem kan onderzoeken. De onderzoeksgroep maakt gebruik van een huisstofmijt-geïnduceerd model voor allergisch astma. Dit model heeft ten opzichte van andere astmamodellen in muizen het voordeel, dat voor de sensitisatie geen ovalbumine in combinatie met een adjuvans toegepast wordt, maar een allergeen dat gerelateerd is aan astma in de mens. De twee – van elkaar onafhankelijke – uitleesparameters 'luchtwegweerstand' en 'ontsteking' worden ook in humane astmapatiënten als zodanig gehanteerd. In dit project worden alleen mannelijke muizen gebruikt, omdat het allergisch astmamodel door de onderzoeksgroep in mannelijke muizen gevalideerd is. Daarnaast werd in een eerdere studie vastgesteld dat voor de parameter 'luchtwegweerstand' alleen in mannelijke muizen duidelijke verschillen waargenomen konden worden na interventie (zie pagina 7 van dit document). Daarnaast leidt het gebruik van één geslacht tot minder variatie tussen dieren, waardoor minder proefdieren nodig zijn voor het verkrijgen van statistisch significante resultaten. In een later stadium zal een vergelijking van resultaten verkregen in mannetjes versus vrouwtjes van toegevoegde waarde zijn voor de translatie naar de mens. Om ongerief ten gevolge van stress tot een minimum te beperken worden behandelingen zo kort en

efficiënt mogelijk uitgevoerd. Ongerief ten gevolge van het herhaaldelijk bijkomen uit anesthesie is niet te voorkomen. De muizen zullen na de sensitisatie en de challenge geen symptomen van allergisch astma ondervinden.

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 – onderzoeken óf en op welke wijze probiotica de ontwikkeling van astma kunnen voorkomen en/of de symptomen kunnen verminderen – substantieel is. De DEC is van mening dat de juiste onderzoeksstrategie gekozen is, onder andere omdat het beschreven muismodel voor wat betreft het allergeen en de symptomen en bijbehorende uitleesparameters een goede benadering is van de situatie in de mens. Het is niet mogelijk om dit onderzoek uit te voeren in mensen, en er zijn evenmin volwaardige *in silico* of *in vitro* alternatieven beschikbaar. 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 matige 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.

Dierexperimentencommissie Utrecht



> 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
AVD108002015355

Bijlagen

2

Datum 18 december 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 18 december 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002015355. 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 plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? 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 februari 2016
Geplande einddatum: 1 februari 2018
Titel project: Effecten van probiotica in een muismodel voor allergische astma
Titel niet-technische samenvatting: Effect van gezondheidsbevorderende bacteriën in een muismodel voor allergische astma
Naam DEC: DEC Urecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Utrecht
Datum: 18 december 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht



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
AVD108002015355

Bijlagen

2

Datum 18 december 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 18 december 2015

Vervaldatum: 17 januari 2016

Factuurnummer: 15700355

Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002015355	€ 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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007
3501 AA UTRECHT
Universiteit 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
Aanvraagnummer
AVD108002015355

Uw referentie

Bijlagen

Datum 15 januari 2016

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 18 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Effecten van probiotica in een muismodel voor allergische astma met aanvraagnummer AVD108002015355. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

U geeft in de aanvraag aan dat er een figuur is bijgeleverd waarin staat beargumenteerd wat het verschil in gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren is. Wij kunnen deze niet vinden in onze stukken. Kunt u dit figuur nogmaals sturen?

U beschrijft dat onder terminale verdoving de luchtwegweerstand gemeten wordt. Hoe u dit doet wordt niet beschreven. Wij willen deze beschrijving wel graag terugzien. Dit hebben wij nodig om de haalbaarheid van het onderzoek navolgbaar te maken en het maakt het beeld compleet van de handelingen aan de dieren waardoor wij kunnen oordelen of inderdaad mannelijke dieren te prefereren zijn. Kunt u een beschrijving geven van de wijze waarop u de luchtweerstand meet?

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuur u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Datum

15 januari 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002015355

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn 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



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.
- | | |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- | | | |
|--------------|---|------|
| Naam | | |
| Datum | - | - 20 |
| Handtekening | | |
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

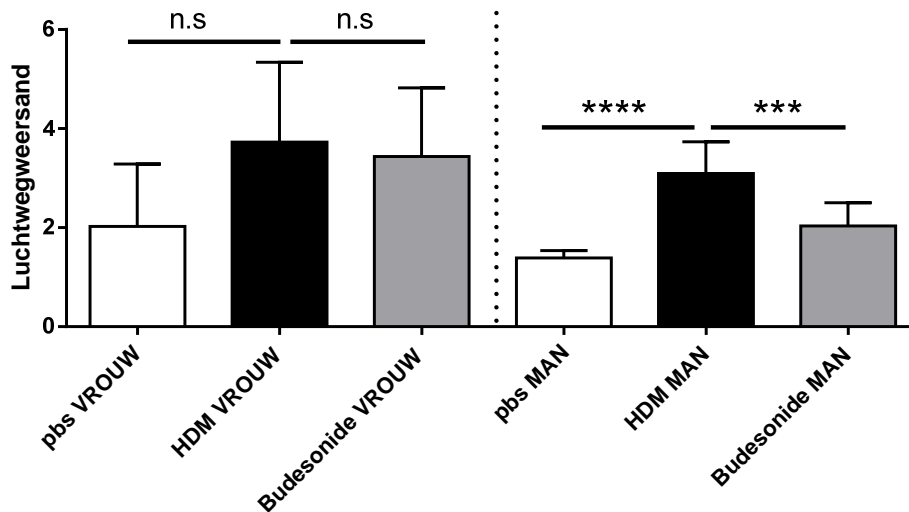
Geachte leden van de CCD,

Vriendelijk dank voor de beoordeling van projectaanvraag AVD108002015355 met als titel: Effecten van probiotica in een muismodel voor allergische astma.

U vraagt toelichting op een tweetal punten. Hieronder zijn deze vragen puntsgewijs beantwoord.

1) Bijgaand figuur 1 waarin het verschil is aangegeven tussen vrouwelijke en mannelijke muizen in het huisstofmijt (HDM)-allergische model.

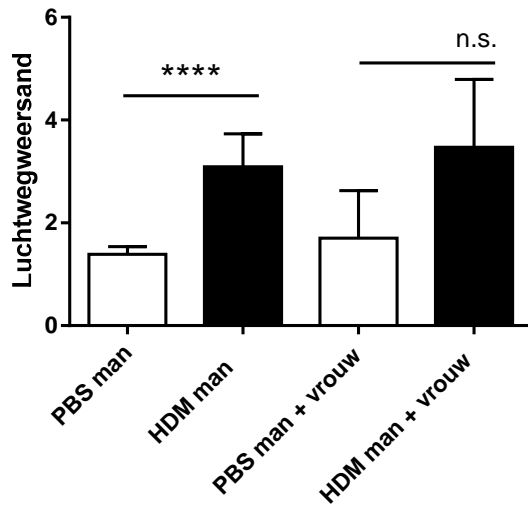
Figuur 1



In figuur 1 is zichtbaar dat er alleen een significant verschil is in de belangrijkste parameter, luchtwegweerstand, in mannen en niet in vrouwen. Dit geldt voor niet allergisch (PBS) versus allergische (HDM) dieren en voor allergische (HDM) dieren versus HDM dieren die behandeld zijn met budesonide. **De significante toename in luchtwegweerstand in HDM allergische mannen** is de basis om mannen te gebruiken voor onze experimenten.

Als aanvullende informatie het volgende: Bij de statistische analyse van **man + vrouw** (n=18) versus **man** (n=9) geldt dat er geen significant verschil is luchtwegweerstand tussen niet allergische dieren (PBS) en allergische dieren (HDM). Zie bijgevoegde figuur 2. Dit geeft aan dat het gemend gebruik van geslachten niet mogelijk is in onze proefopzet.

Figuur 2



2) De primaire parameter luchtwegweerstand wordt op de volgende manier gemeten:

Muizen worden door middel van een intraperitoneale injectie onder anesthesie gebracht, waarna ze beademd worden. Om te voorkomen dat de lichaamstemperatuur van de muizen te laag wordt, liggen de muizen in een verwarmde box waardoor de lichaamstemperatuur 37C blijft. Om de luchtwegweerstand te meten wordt er een canule geplaatst in de trachea van de muis. Oplopende concentraties metacholine(acetyl- β -methyl-choline chloride, 0-25mg/mL) worden toegediend door middel van aerosol gegenereerd in een vernevelaar (EMKA Technologies, Paris, France). Na iedere verneveling wordt de luchtwegweerstand gemeten. Na de laatste meting worden de dieren gedood voor verdere sectie.

Hopende u hiermee voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,

████████████████████



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

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

AVD108002015355

01 FEB 2016

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 18 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Effecten van probiotica in een muismodel voor allergische astma" met aanvraagnummer AVD108002015355. 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 "Effecten van probiotica in een muismodel voor allergische astma" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 februari 2016 tot en met 1 februari 2018.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Urecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 december 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. In aanvulling daarop worden algemene voorwaarden toegevoegd, met het oog op art 10a1 van de Wod. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

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.

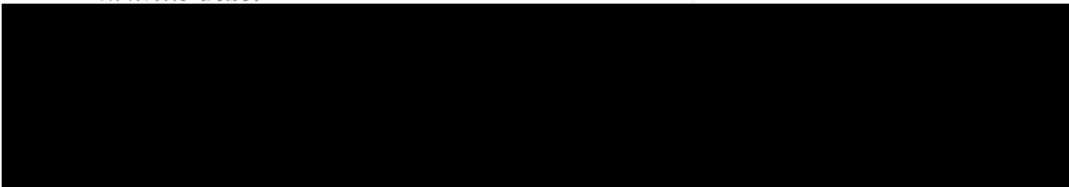
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

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:



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: Universiteit Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 februari 2016 tot en met 1 februari 2018, voor het project "Effecten van probiotica in een muismodel voor allergische astma" met aanvraagnummer AVD108002015355, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Urecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeks- en onderwijsmedewerker. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 18 december 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per brief op 18 december 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 18 december 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 17 december 2015, ontvangen op 18 december 2015.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Proef 1: Huisstofmijt geïnduceerd model voor allergische astma	Muizen (Mus musculus) / BALB/c muis, mannelijke dieren	756	Matig / moderate	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

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 blijvende 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.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2015.II.858.036
2. Titel van het project : "Effecten van probiotica-stammen in een muismodel voor allergische astma"
3. Titel van de NTS : Het effect van gezondheidsbevorderende bacteriën op allergische astma

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: 10-09-2015
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 30-09-2015 en 21-10-2015
- anderszins behandeld: per mail: 04-11-2015
- termijnonderbreking(en) van / tot : 05-10-2015 tot 09-10-2015
23-10-2015 tot 04-11-2015
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 17-12-2015

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: 05-10-2015
- Strekking van de vragen:

Niet Technische Samenvatting

- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: De DEC adviseert u om aan de eerste zin toe te voegen: 'In dit project willen we ... of ze allergie kunnen verminderen of voorkomen...!'
- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: Tevens adviseert de DEC u om de laatste zin te formuleren als volgt: '... die effect heeft op zowel de mate van benauwdheid als ook op de mate van ontsteking.' Dat geeft beter weer dat het juist om de combinatie gaat.
- 3.4 Verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdierendieren: De DEC is van mening dat de toelichting hier wat summier is en verzoekt u ook in te gaan op ongerief dat voortkomt uit benauwdheid, anesthesie, longfunctiemetingen, etc.

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: Hetgeen al bekend is over effecten van probiotica op luchtweg allergie uit de literatuur en uit eigen onderzoek is buitengewoon summier opgeschreven. Het is de DEC niet duidelijk wat er nog niet bekend is c.q. wat dit onderzoek toevoegt aan hetgeen al bekend is. De DEC verzoekt u deze informatie alsnog op te nemen in het projectvoorstel.
- 3.1 Achtergrond: De DEC wil graag inzage in de te testen stammen. Het is voor de DEC nu niet mogelijk om een goede afweging te maken. Indien de probiotica stammen die u gebruikt geheim zijn vragen wij u deze voor te leggen aan een door de DEC te vragen expert op dit gebied. De expert zal de DEC vervolgens adviseren zonder de geheime informatie met de DEC te delen.
- 3.1 Achtergrond: De DEC verzoekt u de termen inflammatie en reactiviteit beter te definiëren en aan te geven wat het verband c.q. het verschil is. Het lijkt erop dat u op zoek bent naar probiotica die beide mechanismen beïnvloeden, alleen of in combinatie. Dit moet helder in de hypothese worden opgenomen.
- 3.2 Doel: U dient zich hier te beperken tot het doel. Tekst over de reeds behaalde resultaten moet naar 3.1 achtergrond, evenals de literatuurgegevens.
- 3.2 Doel: Het doel graag duidelijker beschrijven.
- 3.2 Doel: U gebruikt hier de term 'preklinisch', wat verwarrend is want dit lijkt hier niet aan de orde. Graag verwijderen.
- 3.2 Doel/3.4 Onderzoeksstrategie: U beschrijft indirect wat de hypothese is, namelijk dat de door u gekozen (combinatie van) probiotica effectief zal zijn, omdat deze effect hebben op zowel luchtwegreactiviteit als ook op ontsteking van de longen. Dat zou meer expliciet en uitgebreid bij het doel (en eigenlijk ook al in de achtergrond) opgenomen moeten worden. Graag alsnog doen.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC mist hier de criteria waarbij u het besluit neemt om in muismodel voor allergische astma te gaan onderzoeken. Met andere woorden: de inclusiecriteria ontbreken. Graag alsnog opnemen.

Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De onderbouwing voor de benodigde aantallen dieren is onvoldoende. De N=9 graag nader onderbouwen.
- B. De dieren: In twee jaar worden 12 proeven gedaan, elk met 63 dieren. Betekent dat 36 verschillende probiotica? Graag verhelderen.
- B. De dieren: De DEC verzoekt u het gebruik van uitsluitend mannelijke dieren beter te motiveren.
- B. De dieren: Op p.3, onderste alinea staat: 'Naar verwachting zullen we probiotische stammen los van elkaar en in combinatie van elkaar testen (preventie en behandelstudie).' Deze zin is wat verwarrend. Of iets een preventie- of behandelstudie is wordt bepaald door het tijdstip van interventie, en niet door de in te zetten probiotica. De zin daarom graag wijzigen.
- D. Vervanging, vermindering en verfijning: Onder verfijning staat de zin 'Het eventuele ongerief wat kan optreden kunnen we zoveel mogelijk beperken, maar niet voorkomen'. Hier graag ook aangeven hoe u het ongerief zoveel mogelijk gaat beperken.
- I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen: Hier geeft u aan dat u alleen stress voorziet als eventuele andere vorm van welzijnsaantasting. De DEC vraagt zich af of u niet ook benauwdheid verwacht?
- J. Humane eindpunten: De humane eindpunten zijn niet ingevuld. Graag alsnog doen.
- K. Classificatie van ongerief: U geeft aan dat alle dieren matig ongerief ervaren. De DEC kan zich voorstellen dat de dieren uit de controlegroep (budesonide-behandeling) door 4x extra anesthesie uiteindelijk ook uitkomen op matig ongerief, maar ziet echter wel graag dat het cumulatieve ongerief voor de controle en experimentele groepen afzonderlijk en duidelijker opgeschreven wordt.

Algemeen

- De DEC adviseert u contact op te nemen met de IvD voor een betere afstemming van, met name, bijlage 1. Daarnaast wordt in het projectvoorstel probioticum (enkelvoud) en probiotica (meervoud) door elkaar gebruikt. Graag corrigeren.
- Datum antwoord: 09-10-2015
- Strekking van de antwoorden:

Niet Technische Samenvatting

- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: Deze zin is aangepast in de niet technische samenvatting.
- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: Deze zin is aangepast in de niet technische samenvatting.
- 3.4 Verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren: De verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zijn: Het toedienen van huisstofmijt, PBS en luchtwegverwijder. Dit vindt plaats onder anesthesie, hier kunnen de dieren ongerief van ondervinden. Tevens zullen de muizen licht ongerief ervaren tijdens het vastpakken en

tijdens het toedienen van de probiotica. Muizen hebben geen last van benauwdheid na challenge met huisstofmijt. Alleen tijdens de luchtwegfunctiemeting wordt benauwdheid gemeten, omdat er een prikkel wordt gegeven waardoor de spieren in de luchtwegen samentrekken, maar hierbij zijn de dieren onder anesthesie. De hoeveelheid behandelingen kan wel stress veroorzaken. De dieren ondervinden geen blijvende effecten van een allergische reactie.

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: De effecten van probiotica op astma waren inderdaad summier opgeschreven. Daarom hebben we geprobeerd om deze uitgebreider te omschrijven inclusief de toevoegende waarde van dit onderzoek. Uit literatuuronderzoek is gebleken dat Lactobacillus stammen (vb. Helveticus, Casei, Rhamnosus etc.) en Bifidobacterium stammen (Breve, Bifidum etc.) een effect kunnen hebben op luchtwegweerstand of ontsteking van de longen (Kim et al., J. Appl. Microbiol. 2013; MacSharry et al., Pulm. Pharmacol. Ther., 2012; Jang et al., Allergy Asthma Immunol. Res., 2012). In al deze experimenten is gebruik gemaakt van een ovalbumine geïnduceerd astma model, waarbij gebruikt wordt gemaakt van een adjuvans. Bij het huisstofmijtmodel daarentegen wordt er gebruik gemaakt van een allergeen dat gerelateerd is aan astma in de humane situatie. Tevens is in deze studies de mate van benauwdheid gemeten met behulp van de Penh meting. Deze meting staat onder discussie omdat hiermee niet de longweerstand wordt gemeten, maar veranderingen in de hoge luchtwegen (met name de neus) (Verheijden et al., Front. In Pharm., 2014). In dit experiment wordt gebruik gemaakt van de longweerstandmeting waarbij wel de mate van benauwdheid gemeten wordt. Door in dit experiment nieuwe losse probiotica stammen of combinaties hiervan te testen willen we zowel de mate van benauwdheid als ook de mate van ontsteking remmen. Mogelijk zorgen combinatie van probiotica stammen voor een additieve werking op deze parameters.
- 3.1 Achtergrond: De te testen stammen zijn niet geheim. In dit project wordt gebruik gemaakt van verschillende Lactobacillus stammen (vb. Helveticus, Casei, Rhamnosus etc.) en Bifidobacterium stammen (Breve, Bifidum, Longum etc.).
- 3.1 Achtergrond: We begrijpen dat de termen inflammatie en reactiviteit niet helemaal duidelijk zijn en hebben deze daarom aangepast in ontsteking en luchtwegweerstand in de gehele aanvraag. Na sensitisatie en challenge laten de muizen manifestaties van allergische astma zien zoals die vergelijkbaar zijn met de symptomen in patiënten. Er ontstaat een inflammatie (ontsteking) van de longen met als belangrijkste ontstekingscel de eosinofiele granulocyt. Deze cellen worden geteld na spoeling van de longen. Na een aerosol met metacholine wordt de weerstand van de longen gemeten (mate van benauwdheid). Verscheidene cytokines (zoals IL-4, IL-5 en IL-13) nemen toe in de longspoeling net zoals bij astmapatiënten het geval is (Verheijden et al., Respir Res, 2015; Kool et al., Immunity, 2011; Holgate, Nat Med, 2012). Met behulp van dit project willen we door middel van verschillende (combinaties) probiotica stammen proberen om zowel de luchtwegweerstand als ook de mate van ontsteking te remmen. Beide mechanismen zijn belangrijke parameters in

astmapatiënten. Tevens is de mate van ontsteking niet gerelateerd aan de mate van benauwdheid, wat dus inhoudt dat beide mechanisme los staan van elkaar. Verschillende klinische trials zijn uitgevoerd met antilichamen die gericht zijn tegen IL-5 (een belangrijke cytokine in astma). Ook hieruit is gebleken dat ze alleen effect hebben op de ontsteking en niet op de luchtwegweerstand (Leckie et al., Lancet, 2000; Flood-Page et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2007). Daarom is het belangrijk om zowel luchtwegweerstand als ook de ontsteking te remmen.

- 3.2 Doel: Is verplaatst naar 3.1 achtergrond.
- 3.2 Doel: Het hoofddoel van dit project is het onderzoeken of losse probiotica stammen of combinaties hiervan astmasymptomen kunnen onderdrukken of verminderen, dit in preventie studies en behandel studies. In het preventieve model start de behandeling met probiotica voor de sensitisatie (dus voor het eerste contact met huisstofmijt). In het behandelmodel zijn de dieren al een keer blootgesteld aan huisstofmijt (sensitisatie), waarna de behandeling met probiotica start. Door gebruik te maken van losse probiotica of combinaties hiervan willen we zowel de luchtwegweerstand (mate van benauwdheid) als de mate van ontsteking remmen in huisstofmijt allergische muizen. Combinaties van probiotica stammen worden gebruikt om te onderzoeken of er hier een additieve werking van de probiotica stammen ontstaat.
- 3.2 Doel: Is aangepast.
- 3.2 Doel/3.4 Onderzoeksstrategie: De hypothese is in zowel het doel en de achtergrond explicieter beschreven.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: Het is onderzoeker niet helemaal duidelijk wat de DEC hier bedoelt. We gaan ervan uit dat de DEC vraagt waarom we een muismodel gebruiken voor allergisch astma. Het is nog niet mogelijk om het proces van allergische astma volledig te bootsen door middel van alternatieve testen. Het proces is daarvoor te complex. In de afgelopen jaren zijn er diermodellen ontwikkeld waarin allergie inductie voor astma bestudeerd kan worden (Kool et al., Immunity, 2011; Hammad et al., J Exp Med, 2010). De muizen worden allergisch gemaakt met behulp van huisstofmijt, omdat de muizen geen spontane (meetbare) allergie kunnen ontwikkelen. Na sensitisatie en challenge laten de muizen echter veel, al dan niet alle manifestaties van astma zien zoals we die ook in patiënten zien. Er ontwikkelen zich ontstekingscellen (met name eosinofiele granulocyten), allergeen-specifieke T cellen, en er kan benauwdheid gemeten worden na aerosol met metacholine (Verheijden et al., Respir Res, 2015; Kool et al., Immunity, 2011). Hierdoor is dit model uitermate geschikt om te kijken naar preventie en behandel methodes in allergische astma. Het onderzoeken van het werkingsmechanisme van de probiotica kan alleen in de muis doordat het gebruik van weefsels noodzakelijk is.

Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Naar analogie van eerdere aanwijzingen van de statistiek afdeling hebben we een poweranalyse uitgevoerd op voor dit onderzoek constante en belangrijke parameters. De powerberekening is opgenomen in de aanvraag bij punt A van bijlage 1.

- B. De dieren: Bij elk experiment zijn standaard de volgende groepen inbegrepen: 1) positieve controle, 2) negatieve controle, 3) Budesonide groep, en 4) referentie probiotica groep. Daarnaast worden er maximaal 6 verschillende stammen getest, los van elkaar of in combinaties van 2 of 3 stammen. Enkele stammen die gebruikt worden zijn Lactobacillus Helveticus, Lactobacillus Casei, Bifidobacterium Bifidum, Bifidobacterium Longum etc.

Voorbeelden van studies:

1	3	1	1	2	2	1
2	4	3	4	3	4	2
1+2	3+4	1+3	1+4	2+3	2+4	3
						1+2+3

- B. De dieren: Wanneer in studies gebruik gemaakt wordt van zowel mannelijke als vrouwelijke muizen zal dit leiden tot een grotere spreiding en zijn er meer dieren nodig om statistisch significante verschillen aan te tonen tussen de verschillende behandelgroepen. Indien de DEC de voorkeur geeft aan vrouwelijk muizen, dan zal eerst een experiment uitgevoerd moeten worden om het model te valideren in vrouwelijke muizen. Deze vergelijkende studie brengt het gebruik van extra proefdieren met zich mee. Het belangrijkste argument voor de onderzoekers is dat de vergelijking tussen geslachten niet het doel is van deze studie. Voor translatie zal dit uiteindelijk in de toekomst wel relevant zijn, maar dit valt buiten de onderzoeksvraag. Bovengenoemde bevindingen en onze ervaringen binnen onze afdeling (validatie model in mannen en bijbehorende poweranalyses) liggen ten grondslag aan de keuze voor mannelijke muizen.
- B. De dieren: Deze zin is aangepast in: Naar verwachting zullen we probiotische stammen los van elkaar en in combinatie met elkaar testen in een preventie studie en behandel studie, met als controle behandeling: budesonide en een referentie probiotica (L. Rhamnosus). In het preventieve model start de behandeling met probiotica voor de sensitisatie (dus voor het eerste contact met huisstofmijt). In het behandelmodel zijn de dieren al een keer blootgesteld aan huisstofmijt (sensitisatie), waarna de behandeling met probiotica start.
- D. Vervanging, vermindering en verfijning: Het ongerief wordt zo veel mogelijk beperkt door de behandelingen zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren door ervaren medewerkers.
- I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen: Na sensitisatie en challenge vertonen de muizen geen benauwdheid. Alleen tijdens de luchtwegfunctiemeting wordt benauwdheid gemeten. Dit wordt dan geïnduceerd door een aerosol te geven met metacholine. Hierdoor trekken de spieren van de luchtwegen samen, omdat de dieren hierbij onder anesthesie zijn zullen ze hier geen ongerief van ondervinden.
- J. Humane eindpunten: De humane eindpunten zijn ingevuld onder punt J. Bij dit experiment worden geen omstandigheden verwacht waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd worden, omdat de muizen geen symptomen van allergie ondervinden na sensitisatie en challenge. Tijdens de dagelijkse controle door de diervverzorgers en de reguliere controles door de projectleden zullen acties ondernomen worden wanneer hoog uitzonderlijke abnormaliteiten zoals abnormaal gedrag, beweging, ernstig gewichtsverlies of wondjes waargenomen worden. In dit geval zal er actie ondernomen worden door eventueel het dier individueel te huisvesten en/of er wordt contact opgenomen met de diervverzorgers

en/of de proefdierdeskundige om te kijken of het dier uit het experiment gehaald moet worden om onnodig ongerief te voorkomen.

- K. Classificatie van ongerief: Het ongerief is nu voor alle groepen afzonderlijk beschreven.

Algemeen

- Dit is aangepast.

- Datum: 23-10-2015
- Strekking van de vragen:
 - Bijlage 1, punt B: U heeft hier onvoldoende beargumenteerd waarom u geen vrouwelijk dieren kunt gebruiken. Of u wijzigt uw opzet of u zet uw argumentatie krachtiger uiteen.
 - Bijlage 1, pagina 4, Onderbouwing aantallen dieren: Belangrijk is om aan te geven hoeveel dieren u nodig heeft om uw onderzoeksvraag te beantwoorden; u kunt het aantal dieren niet relateren aan de hoeveel tijd die u heeft voor het uitvoeren van uw onderzoek (2 jaar).
 - Bijlage 1, algemeen: De DEC verzoekt u waar nodig de juiste nomenclatuur te gebruiken voor wat betreft de species en stammen.

- Datum antwoord: 04-11-2015
- Strekking van de antwoorden:
 - Bijlage 1, punt B: Het type diersoort dat zal worden gebruikt in het allergisch astma model is de muis, de BALB/c By JcCo stam. De herkomst van de muizen is een geregistreerd fokbedrijf. Muizen zijn geschikte proefdieren voor immunologisch onderzoek, omdat veel methoden en producten voorhanden zijn om het functioneren van het immuunsysteem te bepalen. De BALB/c muis die wij gebruiken is gevoelig voor de inductie van allergische astma (Hammad et al., Journal of Experimental Medicine, 2010; Verheijden et al., 2015, Respiratory Research). Dit model is gevalideerd in mannelijke muizen. We kunnen geen combinatie van mannelijke en vrouwelijke muizen gebruiken omdat dit zal leiden tot een grotere spreiding waardoor er meer dieren nodig zijn om statistisch significante verschillen aan te tonen tussen de verschillende behandelgroepen. Tevens hebben wij in een eerdere studie aangetoond dat onze belangrijkste parameter (luchtwegweerstand) geen verschillen oplevert in vrouwelijke muizen en wel in mannelijke muizen (zie figuur bijlage). Bovengenoemde bevindingen en onze ervaringen binnen onze afdeling (validatie model in mannen en bijbehorende poweranalyses) liggen ten grondslag aan de keuze voor mannelijke muizen.

Luchtwegweersand

Pbs VROUW

HDM VROUW

Budesonide VROUW

Pbs MAN

HDM MAN

Budesonide MAN

- Bijlage 1, pagina 4, Onderbouwing aantallen dieren: Dit is aangepast in: 12 studies x 63 muizen per studie = 756 muizen voor dit type experiment
- Bijlage 1, algemeen: Is aangepast.
- 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. Allergisch astma is een steeds meer voorkomende chronische aandoening van de luchtwegen die grote invloed kan hebben op het dagelijks leven van patiënten. Tot op heden kan deze aandoening slechts symptomatisch behandeld worden met luchtwegverwijders en ontstekingsremmers, waarbij met name de ontstekingsremmers verschillende bijwerkingen hebben. Er zijn aanwijzingen dat probiotica dankzij hun immunomodulerende werking een gunstig effect kunnen hebben op belangrijke symptomen van astma. De aanvrager wil met behulp van het voorliggende project nader onderzoeken óf en op welke wijze probiotica de ontwikkeling van astma kunnen voorkomen en/of de symptomen kunnen verminderen. Het project zal fundamentele kennis opleveren over de onderliggende mechanismen van allergisch astma en de immunomodulerende effecten van verschillende probiotica. Daarmee kan het project op de lange termijn bijdragen aan de ontwikkeling van probiotische voedingssupplementen ter preventieve en/of behandeling van allergisch astma. Het belang van de doelstelling schat de DEC daarom in als substantieel.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. In dit project worden de effecten van verschillende probiotica in een huisstofmijt-geïnduceerd model voor allergisch astma onderzocht (bijlage 1). De keuze voor de te testen probiotica is gebaseerd op resultaten uit eerder *in vitro* en *in vivo* onderzoek. In de *in vivo* studies hadden de probiotica een gunstig effect op ófwel de luchtwegweerstand ófwel de ontsteking van de luchtwegen. Om te onderzoeken of de geselecteerde probiotica ook een additieve werking kunnen hebben – zowel op de luchtwegweerstand als op de mate van ontsteking – worden de probiotica in dit project op zichzelf staand en gecombineerd toegediend. Ook zullen zij zowel in een preventieve als in een curatieve setting onderzocht worden. 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 bijlage 1 zullen alle dieren van alle experimentele groepen matig ongerief ondervinden, omdat ze herhaaldelijk onder anesthesie gebracht worden (voor sensitisatie en challenge met PBS of huisstofmijt) teneinde allergisch astma te induceren. Toediening van probiotica door middel van orale gavage veroorzaakt licht ongerief.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. De interacties tussen verschillende weefsels en celtypen die een rol spelen bij allergisch astma – en de effecten van een dieetinterventie hierop – zijn dusdanig complex, dat deze niet in hun volledigheid *in vitro* of *in silico* nagebootst kunnen worden. In verband met de opzet van het onderzoek (inductie van allergisch astma om preventieve effecten te kunnen beoordelen) en de aard van de benodigde gegevens (onder andere analyse van cellulaire en humorale parameters in verschillende organen) is het niet mogelijk om het onderzoek uit te voeren in mensen. *In vivo* experimenten met proefdieren zijn dus noodzakelijk.
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. Met behulp van gegevens uit voorgaande studies (onder andere uitgevoerd ter validatie van het beschreven muismodel) worden powerberekeningen uitgevoerd, zodat het optimale aantal dieren per groep vooraf bepaald kan worden. Om onnodig proefdiergebruik te voorkomen worden alleen de meest noodzakelijke experimentele- en controlegroepen meegenomen in het onderzoek.
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 muis is gekozen als modeldier, omdat het immuunsysteem goed in kaart gebracht is en veel overeenkomsten vertoont met het immuunsysteem van de mens. Bovendien zijn veel methoden en producten voorhanden waarmee men het functioneren van het immuunsysteem kan onderzoeken. De onderzoeksgroep maakt gebruik van een huisstofmijt-geïnduceerd model voor allergisch astma. Dit model heeft ten opzichte van andere astmamodellen in muizen het voordeel, dat voor de sensitisatie geen ovalbumine in combinatie met een adjuvans toegepast wordt, maar een allergeen dat gerelateerd is aan astma in de mens. De twee – van elkaar onafhankelijke – uitleesparameters 'luchtwegweerstand' en 'ontsteking' worden ook in humane astmapatiënten als zodanig gehanteerd. In dit project worden alleen mannelijk muizen gebruikt, omdat het allergisch astmamodel door de onderzoeksgroep in mannelijke muizen gevalideerd is. Daarnaast werd in een eerdere studie vastgesteld dat voor de parameter 'luchtwegweerstand' alleen in mannelijke muizen duidelijke verschillen waargenomen konden worden na interventie (zie pagina 7 van dit document). Daarnaast leidt het gebruik van één geslacht tot minder variatie tussen dieren, waardoor minder proefdieren nodig zijn voor het verkrijgen van statistisch significante resultaten. In een later stadium zal een vergelijking van resultaten verkregen in mannetjes versus vrouwtjes van toegevoegde waarde zijn voor de translatie naar de mens. Om ongerief ten gevolge van stress tot een minimum te beperken worden behandelingen zo kort en

efficiënt mogelijk uitgevoerd. Ongerief ten gevolge van het herhaaldelijk bijkomen uit anesthesie is niet te voorkomen. De muizen zullen na de sensitisatie en de challenge geen symptomen van allergisch astma ondervinden.

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 – onderzoeken óf en op welke wijze probiotica de ontwikkeling van astma kunnen voorkomen en/of de symptomen kunnen verminderen – substantieel is. De DEC is van mening dat de juiste onderzoeksstrategie gekozen is, onder andere omdat het beschreven muismodel voor wat betreft het allergeen en de symptomen en bijbehorende uitleesparameters een goede benadering is van de situatie in de mens. Het is niet mogelijk om dit onderzoek uit te voeren in mensen, en er zijn evenmin volwaardige *in silico* of *in vitro* alternatieven beschikbaar. 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 matige 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.

Dierexperimentencommissie Utrecht

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 1 februari 2016 14:29
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: beschikking AVD108002015
Bijlagen: AVD108002015355 beschikking_getekend.pdf

Geachte lezer,

Bij deze sturen wij u de beschikking voor bovengenoemde aanvraag.
De beschikking is ook per post verstuurd.
Wij wensen u veel succes met het onderzoek.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Inventaris Wob-verzoek W16-12S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015356								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x		x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
10	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
11	Advies CCD		x						x
12	Beschikking en vergunning				x		x	x	
13	Mail beschikking 22-2-2016				x		x	x	
14	Mail terugkoppeling DEC 23-2-2016				x		x	x	

22 DEC 2015



Centrale Commissie Dierproeven

1

AVD 40100 2015 356

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? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	40100
		<input type="checkbox"/> 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	9098104
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Akkermaalsbos 12
		Postbus	59
		Postcode en plaats	6708 AB Wageningen
		IBAN	NL10 RABO 0397066465
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> 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 | | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> 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 - 3 - 2016 |
| Einddatum | 31 - 12 - 2019 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Improvement of Animal Health and Production by Innovative Vaccination Strategies
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Verbetering van Gezondheid en Productie in Veehouderij door Optimale Vaccinatie
- 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.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- 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.*

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

- Melding Machtiging
- bestelorder WUR 921840

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

Functie

Plaats

Wageningen

Datum

21 - 12 - 2015

Handtekening





Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see 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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

General information

Vaccination still belongs to the most effective prevention strategies to control endemic pathogens, which are responsible for major losses in farm animals (www.discontools.eu). In this way vaccination

contributes to improved animal welfare and the reduction of the use of medication (e.g. antibiotics and anti-parasitic medication) on farm. However, although vaccines are available for a number of endemic farm animal diseases, the efficacy of vaccines is often limited. This can be due to several factors. Responsible pathogens can continuously evolve new antigenic profiles as in *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus* (PRRSV), which differ from the antigen used in the vaccines. Or, a vaccine has a limited efficacy spectrum as in *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo) vaccines, which only protect against disease and not against infection/transmission. Or the production method of the current vaccine is costly and new vaccines with a broader range of protection and an improved production process is required as in *Eimeria* vaccines.

The project group of the institute (PG) is partner in the recently started EU programme which aims:

- a) to demonstrate the efficacy, safety and cost-effectiveness of promising pre-clinical vaccine candidates against a selection of endemic pathogens (PRRSV, M.hyo, Clostridia, *Eimeria*, *Bovine Respiratory and Syncytial virus* (BRRSV), *Mycoplasma bovis*),
- b) to design generic innovative vaccine strategies by the investigation on mechanisms of immune protection,
- c) to gain knowledge on immune evasion mechanisms and to analyse immunity and immune mechanisms associated with the perinatal period of farm animals,
- d) to explore new vaccine concepts based on subunit vaccines, DNA vaccines, DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) vaccines or new adjuvant-vaccine combinations and new developed administration devices like e.g. transcutaneous patch vaccination.

The EU programme is composed of 22 International partners from academia, research institutes and industry and as usual in this consortia, research is a common activity subdivided over a range of work packages. Animal studies will be performed at different partner institutes and materials from animal studies will be shared between institutes as much as possible. Research strategies as well as animal study designs and results are regularly discussed within the consortium group during the (bi-) annual meetings, but also on a more frequent basis during work package meetings and inter-collegial exchanges.

In this project proposal for the approval of the animal studies performed in the Netherlands we will focus on the studies which will be conducted at our institute in the PG on behalf of the EU-project consortium.

The PG in the EU programme

The PG is involved in five different work packages of this programme and in our animal studies we will focus on:

- a) testing promising pre-clinical vaccine candidates against PRRSV and M.hyo in pigs and *Eimeria* in chickens with regard to efficacy and immune responses (new vaccine candidates)
- b) comparative studies on the immune response in the perinatal period in piglets and chickens for a better understanding of age-related vaccine responses and possibly new vaccine strategies in the new born (neonatal immunity)
- c) the optimization of a new skin delivery system and new adjuvant combinations in pigs and oral and spray vaccination in chickens (vaccine delivery routes and adjuvants)

These three foci will contribute to development of more effective vaccination strategies.

In the following we will provide summarizing background information for each of the three research foci of the experiments performed in the PG as part of the EU programme.

Focus a): New vaccine candidates

PRRSV is the first most damaging infectious pig disease worldwide with abortion problems and serious respiratory problems in nursery and finishing pig units by either direct effects on the lungs and immune system and by favouring secondary infections by other respiratory pathogens. PRRS virus is a RNA virus with two major genotypes, i.e. a PRRSV type I, the European type and a PRRSV type II, the North-American type. Both types differ significantly from each other in virulence as well as in pathogenicity. Within the EU type virus, there are also considerable differences and therefore at least three subtypes are identified on the basis of the genetics and within and between subtypes differences in pathology can occur. PRRSV is poorly immunogenic (Vaccine, 27: 3704), induces a limited antibody response that is i) non protective at early time points and ii) weakly neutralizing at late time points. The T cell arm of anti-

PRRSV immunity, especially the CD8+ T cell cytotoxic response, has been under-investigated.

New vaccine candidates are based on recent identified subtypes of the EU type and next to efficacy of these vaccines, the project focusses on the combination of the vaccines with new adjuvant-combinations, which are directed towards several Toll like receptors (TLR) on antigen presenting cells (APC) and are used to promote the immunogenicity of antigens in vaccines. Our institute and especially the PG has a long standing experience in research in PRRSV virology and host immunity (Vet Microbiol 163 : 1). The developed expertise and animal models are used for vaccine evaluation and also comparative studies on virulence and pathogenicity of various strains and immunology of the host.

M. hyo is the main player in the respiratory disease complex of pigs and current vaccines are moderately able to prevent clinical disease, but do not interfere with the infection process and do not stop the transmission process in a pig herd. New vaccine candidates will be identified by partners within the EU programme and immunogenicity and efficacy will be tested with or without combination with PRRSV vaccines in the PG.

Eimeria spp. are intestinal parasites, which are responsible for enteric coccidiosis in chicken. This disease has a severe course in young chicken and prevention requires either vaccination with a costly live vaccine or an extensive chemoprophylaxis. The immune mechanisms of protection against *Eimeria* are not known and may involve Natural Killer (NK) cells, Th1/Th17 and detrimental Regulatory T (Treg) cell responses (J Immunol 173: 2675).

The new developed vaccines will be based on transgenic constructions (J Vaccines Vaccin 2012, 3:5). But next to the vaccine compound are the way of administration to the mucosa (oral or spray) as well as the age of vaccination of interest (in-ovo, post hatching).

Focus b): Neonatal immunity

Neonates show major differences with adults regarding their innate and acquired immune responses, both due to interferences of maternal derived antibodies (MDA) and to the maturation development stage of the immune system. Most knowledge in neonatal immunity has been obtained in mice, in which the immature immune system was shown to be biased towards Th2 immunity. In farm animals, young animals present a critical period of sensitivity to pathogens when the MDA decrease beyond protective levels and when self-immunity has not yet been triggered by vaccination. To reduce this gap of immunity, vaccine strategies that include the use of adequate adjuvants and optimal delivery systems need to be developed taking into account the specificity of the young age immune system and alleviating the MDA interference. In chickens, foetal in ovo vaccination has been introduced for few vaccines. The advantages of in ovo vaccination are the early onset of immunity in neonatal chickens coupled with the convenience by which a large number of embryos can be vaccinated. It is not known whether *Eimeria* antigens administered in ovo induce mucosal immune responses in the neonatal chicken.

Focus c): Vaccine delivery route and adjuvants

The vaccine route of delivery can be key for optimal vaccine efficiency. Intranasal (IN) and oral vaccine delivery has shown to direct the immune effectors to mucosa for optimal mucosal defence which is often the first line of defence to pathogens. In chickens, live vaccines are administered by spray or orally but the ability of these routes to reciprocally induce lung and intestinal immunity is not known. Transcutaneous (TC) vaccine delivery appears superior to other systemic routes to induce potent B and T cell immunity and sometimes mucosal immunity (Expert Rev Vaccines 7: 1201). New production technologies like immune patches facilitate easy application and mass application, but the functionality and conformation needs to be studied.

The TC advantages have been demonstrated in rodents and non-human primates (Adv Funct Mater 14: 161) but to date, no studies have been published in farm animals. A partner of the EU programme has licensed a novel dissolving microneedle patch technology ('DMN patch') for optimal TC delivery and vaccine stability and they have the know-how to manufacture towards scalable, cost effective and practical use.

Adjuvants contain molecules that stimulate antigen presenting cells (APC), for example appropriate combinations of Toll-like receptor ligands (TLR-L), and generally have an excellent capacity to enhance vaccine efficacy. This permits conversion of poorly immunogenic antigen into effective vaccines by adding an adjuvant (TLR-L) resulting in induction of early protection, enhanced duration of immunity, induction of a broader immune response efficacious against antigenic variants, reduction of individual variability to assure better vaccine coverage, and reduction of antigen dose in vaccines making them more economical

(Nature,470: 543). High levels of systemic antibodies may also “spill-over” to mucosal sites and thereby prevent colonisation with the pathogens.

The selective expression of TLR by different APC subsets (J Exp Med 194 : 863) and their reactivity to TLR-L differ among species (Dev Comp Immunol 34 :572) and most likely between different age groups (perinatal vs adult). So further investigation is needed to provide further insights in the use of adjuvants (TLR-L) and their effects on different age groups regarding to enhance vaccine effectivity.

Especially work in focus B and C will form a substantial part of the research project of a PhD candidate, who will participate full time in this project in the PG. The focus of the PhD candidate will be on neonatal immunity and the possibilities of adjuvants to enhance the vaccine response.

3.2 Purpose

Describe the project’s main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The general objective of the EU programme is to evaluate and develop promising new vaccine candidates and generate effective vaccination strategies towards the control of endemic pathogens as PRRSV, M. hyo and *Eimeria*. New vaccines for such relevant endemic diseases should lead to improved viability, sustainability and profitability of food animal production systems, improved animal welfare and reduced medication (e.g. antibiotic) usage in farming.

The PG participates in a previous determined part of the project with objectives contributing to the general objective of the EU programme

The research objectives of the institute are:

Focus a): New vaccine candidates

As mentioned before, several international partners are working together on the objectives of the EU programme and one major task of the PG is vaccine efficacy and mainly the initial response testing of new vaccines against PRRSV, M.hyo and *Eimeria* in the target species pig or chicken. The selection of the new vaccine candidates is based on antigenetic profiling or molecular analysis combined with in-vitro and limited in-vivo results which will result in suitable candidates for further vaccination studies.

Due to the expertise of the institute and especially the PG on PRRSV and *Eimeria* (Vet immunol Immunopathol 117: 26) infection models the feasibility to test vaccine efficacy is high. Infection models with M. hyo are frequently described in literature. The PG does not have recent experience with this specific model, but in regard to our experience with respiratory disease models in pigs and close collaboration with other experienced institutes within the EU programme the use of the mycoplasma challenge model is also feasible.

The purpose of the studies is not only to show vaccine efficacy and the protection of the animals against disease or reduction of pathogen load, but also on the determination of the immunological response. The experience of the PG with the respective animal models (PRRSV, *Eimeria*) and the measurement of the relevant immunological response parameters in chicken and pigs (serological parameters, T-cell immunity) make this objective very achievable.

Focus b): Neonatal immunity and adjuvants

The mentioned endemic infections/diseases affect young animals, often at a time point, when maternal immunity vanishes and an own immune response is insufficiently developed. A substantial part of the mentioned PhD project is the comparative evaluation of the functionality of APC in piglets and chicken in the perinatal period compared to older animals with a fully developed immune system. Work will address circulating and local APC combined with the presence of TLR and the interplay of APC with other immune cells and adjuvants (TLR-L), generally and in the context of the investigated endemic pathogens and vaccine. The cooperation with highly experienced international groups in APC and TLR expression within the EU programme, the availability of descend screening systems for effectiveness of TLR-L at our institute and the partner institutes within the EU programme and the interaction with and support by renowned partners on pig immunology in Switzerland and chicken immunology in Scotland (both part of

the EU programme) strongly supports the achievability of this project part.

Focus c): Vaccine delivery routes

Another main objective that addresses generic vaccine strategies is directed towards the vaccine delivery routes. The immune response after transcutaneous vaccination in pigs will be investigated and compared to other vaccination methods (intra nasal, oral and intramuscular). For chicken the immune response after oral or spray vaccination will be compared to vaccination in ovo with a focus on the mucosal immune response. The specificities of immunity and immune responses during perinatal development in piglets and chickens will be intergraded in this part and shows the strong overlap between focus a) and b). Again the cooperation with expert groups on vaccine formulation and vaccine devices within the EU programme and our own experiences in the PG with the animal infection models as well as with infection studies in young age piglets and chickens make this objective also achievable in respect to the descend performance of the studies.

Summarizing the PG is investigating the optimal age of vaccination together with the optimal vaccination route and the most suitable adjuvant which all together contribute to a more effective initial immune response in target animal pig and chicken. Multiple experiments will be conducted in the PG to achieve these objectives. The experiments are described in more detail under 3.4.2.

3.3 Relevance

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

Scientific relevance

The EU programme has been designed to “better understand the interaction between the immune system and their specific pathogen” by identifying immune mechanisms of protection and of sensitivity to pathogens to induce the right effectors of immunity towards the best antigens.

Weak immune responses associated with the perinatal stage (in ovo, young age) will be evaluated and mucosal protection will be improved, because most endemic pathogens enter the host via mucosal surfaces.

The EU programme will aim at “fostering an earlier onset of protection and a longer duration of immunity taking into account different developmental stages” by using new adjuvants, vector vaccines, formulations, vaccine combinations and delivery strategies. The PG will contribute by conducting experiments with a focus on neonatal immunity, efficacy of new vaccine candidates and new delivery strategies.

Social relevance

The EU programme will develop vaccines and companion tests to enable sero-epidemiological monitoring of disease by distinguishing infected from vaccinated animals (DIVA) for controlling vaccine effectiveness and for eradication programs. Efforts will be made to develop safer vaccines, with control of attenuated vaccines to avoid reversion to virulence and generation of vector vaccines without propagative potential. The EU programme will provide mathematical models for predicting the epidemiological consequences of vaccination, such as vaccine effect on pathogen transmission and risk of pathogen escape.

The development of affordable and cost-effective vaccines will be promoted, including vaccines that can be stored and supplied without the need for cold chains. The previous described research foci of the PG will indirectly contribute to the achievement of this general social objective.

3.4 Research strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

General overview of EU programme

The EU programme is organized in four research pillars (A, B, C and D) and each research pillar is divided in work packages. Besides the research pillars there is one management pillar (F) and one dissemination pillar (E) to ensure adequate project management and communication of achieved results (see figure 1).

Pillar A consist of a socio-economic context analysis of the EU programme diseases and their control measures. Pillar B concerns the development of specific vaccine strategies and candidates. Pillar C is focussing on the development of generic vaccine strategies. Pillar D will develop strategies to translate EU programme research into the market and into the field.

The PG with the EU programme

The PG participates in pillar B (focus a): New vaccine candidates) and C (Focus b) and c) Neonatal immunity/Vaccine delivery routes and adjuvants).

Focus A: New vaccine candidates

Development of pathogen-specific vaccine strategies

- Chicken: Eimeria
- Pig: M.hyo and PRRSV

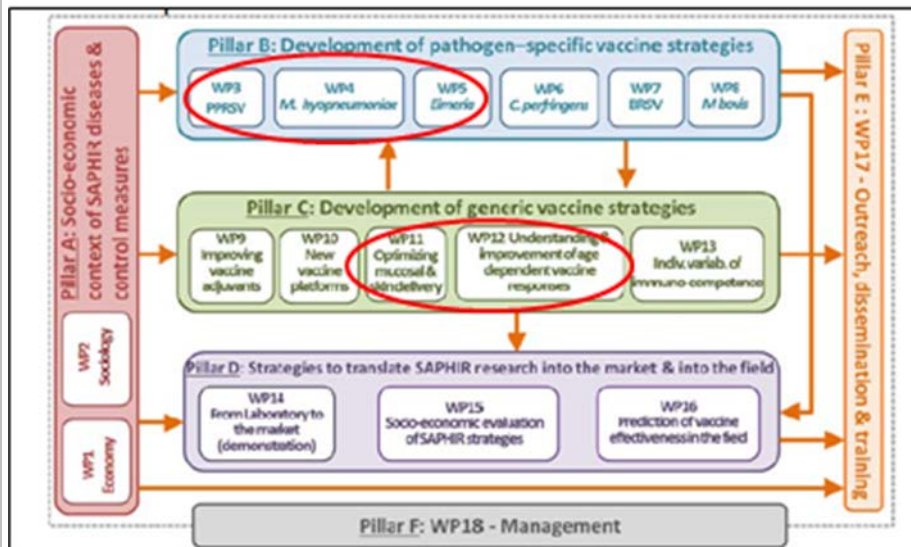
Focus B: neonatal immunity

Understanding and improvement of age dependent vaccine responses

Focus C: vaccine delivery routes and adjuvants

Optimizing mucosal and skin delivery

Figure 1: overall design of the EU programme named SAPHIR (Strengthening Animal Production and Health through Immune Response)



3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

The PG will conduct five different projects(tasks) within the EU programme . Each task (described separately below) is part of one of the previously described foci and contains in general one animal experiment (up to 3 experiments per task can be needed to address the specific research question).

Focus a): New vaccine candidates

1. Efficacy of a new PRRSV vaccine against heterologous challenge with PRRSV

Young PRRSV-negative pigs will be vaccinated with the new PRRSV vaccine via intramuscular (IM) route and challenged with a virulent PRRSV strain. The animal model for PRRSV has been developed and used frequently at the PG. The virus infection usually results in slight increase in body temperature and mild respiratory distress. Clinical observation results, body temperature curves and virus load in blood and tissues as well as histopathological findings in lungs and lymph nodes will be used to determine protective efficacy. After vaccination and challenge antibodies will be quantified longitudinally and blood T cell response will be measured as read out for immunogenicity (see 3.4.4 serial number 2).

2. Measuring the vaccine responses of new M. hyo vaccines

M. hyo free pigs will be vaccinated with the new vaccine candidates, which are selected on basis of in vitro or preliminary immunological response parameters. Efficacy responses upon vaccination with new vaccines and after administration via different administration routes will be assessed during vaccination period and after challenge. M. hyo-specific T cell responses (cytokines and proliferative responses) will be measured. Serum and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid, which will be obtained during vaccination phase and prior to challenge and will be tested for the presence of specific antibodies. The used M. hyo animal infection model will be established together with another partner within the EU project, who has already extensive experience with this model (see 3.4.4 serial number 2).

Focus b) and c): neonatal immunity, vaccine delivery routes and adjuvants

3. Responses to TLR ligands of immune cells from pigs of different age classes

From pigs of one week and 12 weeks of age, APC and lymphocytes will be isolated from blood and tissues in order to study TLR dependent immune responses in vitro. The cytokine responses to different adjuvants/TLR -L in will be measured and the best TLR -L (adjuvant) at young age will be selected for transcutaneous vaccine formulations in vivo (see 3.4.4 serial number 1).

4. Induction of mucosal response/ immunity after in ovo vaccine compared to oral and spray vaccine administration directly after hatch in chicken

The mucosal response in the respiratory tract and intestinal tract after in ovo vaccination with Eimeria antigens in comparison with Eimeria live vaccines will be studied in chicken and compared to responses obtained after vaccination directly after hatch by spray or oral route. The B and T-cell responses in the mucosal surface (lung and intestine) will be analysed (Th1, Th2 and CD8+ T) (see 3.4.4 serial number 3).

5. DMN patches with PRRSV vaccine and protective immunity

The PRRSV vaccine and the selected adjuvants will be formulated with appropriate excipients for stabilization in DMN. Critical quality attributes (antigenicity, biophysical properties) will be checked. Full and partial dose will be fabricated to assess the dose-sparing capacity. Rearing and neonatal pigs will be immunized with adjuvanted and inactivated PRRSV using DMN patches and by intramuscular route. The site of patch administration will be closely monitored for local adverse events after each vaccination and the convenience of use will be evaluated. The magnitude and isotypes of serum and mucosal antibodies and circulating T cell responses will be assessed. The protection against a virulent PRRSV challenge will be measured (see 3.4.4 serial number 2).

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

Activities in the PG in Focus a), b) and c) as part of the EU programme are connected in first instance by the use of the same antigens and the transfer of obtained immunological knowledge in focus b) and c) to the new vaccine formulations in focus a). The progress in the development of the new vaccines will be continuously evaluated by the WP members of the EU programme and the general project management (Pillar F) and specific milestones for all the work packages and animal procedures are described in the EU programme.

The first animal procedure in the PG will involve the comparative research on neonatal immunity in pigs and in chickens (Focus b) in vitro in combination with the different TLR-L. Animal procedures will only be started if the PG has established the necessary immunological assessments, especially in regard to TLR expression analyses and specific cellular immune assays which will be obtained through close collaboration with experienced partners of the EU programme.

If new vaccine candidates or vaccination deliveries in focus b) and c) show no clear statistical powered results in efficacy they will not be selected for further use in vaccination trials.

The final vaccination experiments in focus a) depend on the results of the challenge experiments performed by other partners within the EU programme. Protective efficacy studies in the PG will only be performed if the used animal model offers sufficient statistical powered results in regard to the protection key parameter, i.e. reduction in pathological lesions and pathogen load.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Blood and tissue sampling for in-vitro studies in pigs
2	M.hyo and PRRSV vaccination studies in pigs with challenge
3	<i>Eimeria</i> vaccination studies in chickens with or without challenge
4	
5	
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'.	40100	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Blood and tissue sampling for in vitro studies in pigs

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.

Neonates show major differences with adults regarding their innate and acquired immune responses, both due to interferences of maternal derived antibodies (MDA) and to the maturation development stage of the immune system. In pigs, young animals present a critical period of sensitivity to pathogens when the MDA decrease beyond protective levels and when self-immunity has not yet been triggered by infection or vaccination. To reduce this gap of immunity, vaccine strategies that include the use of adequate adjuvants and optimal delivery systems need to be developed taking into account the specificity of the young age immune system and alleviating the MDA interference.

Antigen presenting cells (APCs) play a key role in processing and of course presenting antigens to the immune cells in the innate immune response. APCs are primarily at sites, where pathogens can enter the body, like skin, respiratory tract or intestinal tract and in the lymphatic system. For in vitro research purposes APCs are often generated from blood derived monocytes or bone marrow derived monocytes. In vaccines, adjuvants are used to enhance the immune response after vaccination. They often contain molecules that stimulate APC One mechanism can be binding e.g. to a Toll-like receptor (TLR) on a APC which contributes to enhanced vaccine processing and ultimately vaccine efficacy. This permits conversion of poorly immunogenic antigen into effective vaccines by adding an adjuvant with a TLR ligand, which ligates to the TLR on the APC resulting in an induction of early immune response with an enhanced duration and induction of a broader immune response efficacious against antigenic variants.

Pigs of one and 12 week of age will be used to investigate the presence of TLR on APCs in blood and tissues and the efficacy of different TLR-ligands on immunogenicity in neonatal and immunocompetent animals. Blood and tissue will be isolated after euthanasia to study in vitro the TLR dependent immune responses in APC and lymphocytes in order to select the best TLR-ligand (adjuvant) and the age with the

most effective response.

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

Euthanasia of animals to sample blood and tissues to measure parameters and perform in vitro experiments to study the difference in immune response between pigs of one week (neonatal group) and pigs of 12 weeks (immunocompetent group).

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

For the individual studies data from own previous experiments in the project group of the institute (Vet Microbiol 163 : 1). and from literature review were used to estimate the number of animals to be used and the expected differences in the key parameters of the experiment.

Depending on the key parameter necessary group sizes can vary. This results together with the expected relative standard deviation has been used in a statistical computer program (R studio) to calculate the expected number of needed animals for significant study results. Studies will be designed to achieve a power of 0.8 and a significance level of $P < 0.05$.

In the course of the project, for each study plan a calculation of the number of the minimal number of animals will be justified on the above mentioned criteria.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Specific pathogen free pigs of a high health breeding farm, male and female

- 20 animals of 1 week old to represent the neonatal group
- 20 animals of 12 weeks old to represent the immunocompetent group

C. Re-use

Will the animals be re-used?

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'?

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.

The minimal number of animals will be used to compare expression profiles of APCs in blood and different tissues and to achieve significant results within outbred animals. In the same animals samples from different tissues will be collected and compared. Colleague researchers within the EU programme will be informed about the use of these animals to ensure possible additional use of tissues.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

The animals will be sedated before euthanasia to minimize pain and fear.

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 described experiment has not previously been performed based on review of published articles.

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 of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

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?

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.

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.

The animals will be anaesthetized before euthanasia.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

No other adverse effect will be expected.

Explain why these effects may emerge.

Not applicable

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

Not applicable

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.

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

Indicate the likely incidence.

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').

Euthanasia – Mild

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The extensive sampling of variable tissues cannot be combined with recovery after the procedure and euthanasia is needed to prevent severe discomfort.

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

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

Yes



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'.		
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	2	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> (M.hyo) and Porcine Reproductive and Respiratory Virus (PRRSV) vaccination studies in pigs with challenge

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.

New pre-clinical vaccine candidates to control M.hyo or PRSSV will be assessed for protective efficacy and immunogenicity. M.hyo and PRSSV are both important endemic respiratory pathogens and responsible for major losses in pig farming. New vaccine candidates, which are developed within an international collaboration (EU programme) are based on new formulations and/or adjuvant combinations. The vaccine aim to achieve a better protection against infection or fostering an earlier onset of protection and a longer duration of immunity taking into account age and different development stages in immunity of the animal.

To address these objectives the animal experiments within the project group of the institute (PG) will focus on improvement of vaccine efficacy compared to existing vaccines or on effect of age at time point of vaccination (neonatal vs adult) and/or on the route of vaccination (intranasal (IN), intramuscular (IM) and dissolving microneedle patch technology (DMN patch)) to provide an optimal vaccination strategy in combination with the new vaccine candidate. Generally vaccination effects of new vaccine candidates or adjuvants will be compared to non-vaccinated control animals and according to the principal objective of the individual study also dose effects of vaccines and/ or adjuvants can be studied.

During the experiments several procedures (described in the second part of 2A) will be conducted in order to measure parameters (e.g. clinical signs, antibody response, viral excretion, T-cell response and pathologic findings during necropsy) which will evaluate the efficacy of the new vaccine.

Three different projects (studies) on behalf of the following objectives will be conducted in the PG as part of the I EU programme. The studies contain in general one animal experiment, but to address to specific research question more experiments (up to 3) can be needed.

Study 1: Efficacy of a new PRRSV vaccine against heterologous challenge with PRRSV

Young PRRSV-negative pigs will be vaccinated with new PRRSV vaccines via intramuscular (IM) route and challenged with a virulent PRRSV strain. Clinical observation results, body temperature curves and virus load in blood and tissues as well as histopathological findings in lungs and lymph nodes will be used to determine protective efficacy. After vaccination and challenge antibodies will be quantified longitudinally and blood T cell response will be measured as read out for immunogenicity.

Study 2: Measuring the vaccine responses of new M. hyo vaccines

Model developing: In a first step a M. hyo animal model will be established. Recent M. hyo isolates will be selected and studies to define infection dose and infection route will be performed. In one animal experiment with three different challenge doses and two different administration routes the induction of typical histological lung changes will be studied and infection kinetic and location of M. hyo in the lungs determined. Only if this study mode shows statistical powered results in regard to the protection key parameter, i.e. reduction in pathological lesions and pathogen load this model will be used for further vaccine immunogenicity and efficacy studies.

For vaccine immunogenicity and efficacy studied, M. hyo free pigs will be vaccinated with the new vaccine candidates, which are selected on basis of in vitro or preliminary immunological response parameters. Efficacy responses upon vaccination with new vaccines and after administration via different administration routes will be assessed during vaccination period (ca. 6 weeks) and after challenge. M. hyo-specific T cell responses (cytokines and proliferative responses) will be measured. Serum and broncho-alveolar lavage (BAL) fluid, which will be obtained during vaccination phase and prior to challenge, will be tested for the presence of specific antibodies.

Study 3: patches with PRRSV vaccine and protective immunity

Newly developed patches with microneedles will be studied in combination with different adjuvants and PRRSV vaccines on their effects on the systemic and local immune response in new-born piglets and immunocompetent older pigs. Therefore DMN patches will be formulated with appropriate excipients for stabilization in DMN. Initial experiments will be done to compare immune effects and to improve the design of the DMN patches. Therefore, local immune responses in the skin, the regional lymph nodes and the blood will be studied. Later full and partial doses will be fabricated to assess the dose-sparing capacity. About 10 week old pigs and neonatal pigs will be immunized with adjuvant and inactivated PRRSV using DMN patches or by intramuscular route twice at 3 weeks intervals. The site of patch administration will be closely monitored for local adverse events after each vaccination. The magnitude and isotypes of serum and mucosal antibodies and circulating T cell responses will be assessed. The protection against a virulent PRRSV challenge will be measured.

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

Blood sampling

- Blood will be extracted at various time points in the procedure from the jugular vein in the neck or from the vein in the ear
 - The extracted volume will never exceed 8ml/kg body weight within 2 weeks (according to Handboek Proefdierkunde, vijfde druk)
 - Repeated blood sampling is needed to evaluate the efficacy of the vaccination at different time points in the experiment;
 - Generally, in the vaccine studies, there will be a minimum of 24h between two consecutive samplings and sampling frequency is depending on the type and duration of the study between 3 and 10 times
 - In the case that a more frequent blood sampling within 24 hours is necessary ear vein catheters will be used. For the introduction and fixation of the catheters pigs will be anaesthetized.
 - In studies which address early immune responses like the study with DMN patches a more frequent sampling on the day of administration will occur; the use of ear vein catheters or direct intravascular blood sampling will also be discussed with the IVD.
-

Vaccination

- A maximum of three vaccination will be administered to the animals. One initial vaccinations and one or two booster vaccinations. Two vaccinations at one time point will only be applied in the combined M.hyo and PRRSV vaccination trial, followed by a booster vaccination. In different studies, different routes of vaccination will be used and determined according to the objective of the individual study:
- Intramusculair (IM) vaccination: the vaccine will be applied in the muscle in the neck, on the back or in the hind limb. A maximum of 2 ml will be injected in one IM injection place. The injection place will be monitored for adverse events and the booster vaccination will be injected at a different part of the body.
- Oral vaccination: max. 10 ml of vaccine will applied to the oral cavity with fixation of the head and use of stomach catheter and mouth opener
- Intranasal vaccination: max. 3 ml of fluid will be dispended either as droplets or as aerosols in both nasal cavities and the head will be fixated for minimal 15 seconds with the nose in an upward position
- dissolving microneedle patch vaccination: dermal patches (ca. size 4x4 cm) will be attached to the skin.

The vaccination is needed to conduct the experiment

Challenge with pathogen

- PRRSV: inoculation of pathogen in nasal cavity (max. 5 ml fluid, as described in intranasal vaccination)
- M.hyopneumoniae: Intratracheal a maximum of 2 ml phosphate-buffered saline (PBS) with pathogen will be applied during general anaesthesia.

The challenge with the pathogen is needed to measure efficacy of the vaccination

Broncho-alveolar lavage (BAL)

- BAL will only be performed in studies, where the development of a local response in the lung has to be addressed. This will take place most probably in the second half of project period.
- BAL will only be performed once in two weeks with a maximum of 4 procedures. The last procedure will be performed just before euthanasia.
- General anaesthesia (injection anaesthesia) will be applied before the procedure
- A tracheal tube will be placed in mouth and upper part of trachea introducing a catheter through the mouth via the trachea in the diaphragmatical lobe.
- 3 time 15 ml of saline fluid will be introduced into the lung and the fluid will be aspirated after each administration

The BAL provides valuable additional information on the development of the local immunity in the lungs being an important parameter since the new vaccines are developed for respiratory pathogens

Nasal and tonsillar swab

- Will be taken before and after challenge; frequency of sampling will be determined by the type of challenge. Usually, about 7 to 10 sample time points just before and after challenge are defined (PRRS, mycoplasma); this, however is depending on the exact study design and will be discussed with the IVD to minimize the number of sampling time points.
- Restraint is needed to take a nasal swab and for tonsil swab a mouth opener will be used

The swabs are needed to evaluate excretion of pathogen after vaccination and or challenge

Biopsy sampling:

- General anaesthesia (injection anaesthesia) will be applied before the procedure
- Biopsies will be performed on the site of patch administration and on control sites
- If several patches are administered and the animal should be kept in the study biopsies are taken from a maximum of 2x2 sites, otherwise the pig will be euthanized.

Skin biopsies will be necessary to determine the early local immune reaction after vaccination with DMN patches.

Euthanasia

- Animals will be sedated before euthanasia

- Tissue and blood sampling after euthanasia and BAL if applicable
- Extensive sampling of tissue and blood and evaluation of the pathologic findings is needed to make a complete interpretation of the vaccine efficacy and immunogenicity

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

For the individual studies data from own previous experiments (Vet Microbiol 163: 1) and from literature review were used to estimate the number of animals to be used and the expected differences in the key parameters of the experiment.

Depending on the key parameter necessary group sizes can vary. This results together with the expected relative standard deviation has been used in a statistical computer program (R studio) to calculate the expected number of needed animals for significant study results. Studies will be designed to achieve a power of 0.8 and a significance level of $P < 0.05$.

In the course of the project, for each study plan a calculation of the number of the minimal number of animals will be justified on the above mentioned criteria.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Specific pathogen free pigs (male and female) of a high health breeding farm are being used.

In total maximal 200 animals will be used with variable ages. This number is based on statistical evaluation and the necessary number of control animals combined with literature review and will be adjusted based on the results of the consecutive experiments in this project.

A maximum of 45 animals of the 200 animals will be < 1 week (neonatal) at the start of the experiment. These animals weaned at about one day after birth, so that they are enabled to take up sufficient colostrum. The earlier weaning is necessary to acquire sufficient piglets with different genetic background without necessity to also include sows in the experiment.

Neonatal piglets are needed to investigate the influence of age on vaccination efficacy.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

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'?

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: for the safety of the vaccination and measurement of the efficacy use of the target animal is needed. The complex interaction between pathogen, vaccination and immunity of target animal cannot be replaced by model in which no animals are used. New vaccines will be first tested in cell cultures (in vitro) before testing on the target animal, to prevent unnecessary animal use.

Reduction: In each experiment a critical evaluation will be done in regard to necessary minimal number of animals to the key parameters. This evaluation is based on a range of own experiments in the case of PRRSV and will be discussed with experienced colleagues from the field of mycoplasma research for M. hyo.

Refinement: the animals will be accommodated according to European guidelines with extra attention for the size of the groups, optimal feeding and drinking, stable climate, ground cover and toys. The animals will be monitored twice a day during critical periods of the experiment or during veterinary emergency.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

The described procedures in 2A can cause pain and fear for the animals and the challenge with the pathogen can cause illness and suffering. For the blood sampling, nasopharyngeal swab sampling, vaccination and challenge with pathogen no measures will be taken to minimize the pain and fear. The BAL sampling and biopsy procedure will be performed under general anaesthesia and the animals will be sedated before euthanasia to minimize pain and fear.

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 described experiments have not previously been performed based on review of published articles.

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 of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

All pigs, which are used at an age older than 6 weeks will be kept according to Annex III. Very early weaned pigs (one day old when they are separated from the sow) will be kept in housing conditions with bedding and shelter with a heating source and extra attention will be paid to room temperature. In the first days extra attention will be paid to the ability of the individual pig to take up special baby pig milk. This will be controlled at least four times per day in the first three days.

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?

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.

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.

The animals will be anaesthetized before euthanasia to reduce fear and ensure that the fluid used for this procedure will be strictly intravenously.
BAL sampling and biopsy procedures will be done under general anaesthesia. The other procedures will be performed without sedation. The blood sampling, nasopharyngeal swab sampling and vaccination will cause fear and a minimal amount of short pain, but an sedation prior to these procedure will cause the same level of discomfort as the procedure by itself.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The challenge with the virus can cause illness and discomfort (especially if control animals are used) and the vaccination can cause a local reaction in the muscle and skin. Blood sampling can induce the formation of an hematoma around the punctured blood vessel. PRRSV infection courses usually subclinical effects with a short (1-3 day) increased body temperature. M. hyo infection can cause mild respiratory distress symptoms.

Explain why these effects may emerge.

Although it is likely that vaccination will prevent illness after challenge in the most cases , there will always be individual variability and animal can be affected and show clinical illness. The control animals will experience mild respiratory problems.

Application of vaccination fluid in skin or in muscle can give a local reaction in and around the injection side. Although it is not expected it cannot be excluded that new adjuvants can induce side effects at the location of vaccination.

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

Challenged and vaccinated animals will be closely and daily monitored for illness with a special focus on respiration. The following parameters will be measured daily (general impression (activity), respiration rate, food consumption and body temperature). In case of illness and discomfort responsible veterinarian will be consulted and with severe illness and suffering (human endpoint) the animal will be euthanized.

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.

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

- Severe respiratory distress/ open mouth breathing
- Blue discoloration of ear tips and distal ends of limbs (hypoxia/ischaemia)
- According to Good Veterinary Practice

Indicate the likely incidence.

This incidence is unlikely.

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').

Blood sampling- moderate

Vaccination- moderate

BAL- mild/ moderate

Challenge with pathogen- moderate

Overall discomfort- moderate

Euthanasia - mild

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The extensive sampling of variable tissues cannot be combined with recovery after the procedure and euthanasia is needed to prevent severe discomfort.

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

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

Yes



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'.	40100	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	3	<i>Eimeria</i> vaccination studies in chickens with or without challenge

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.

Eimeria spp. are intestinal parasites, which are responsible for enteric coccidiosis in chickens. This disease has a severe course in young chickens and prevention requires either vaccination with a costly live vaccine or an extensive chemoprophylaxis.

The focus of the project group of the institute (PG) for the *Eimeria* vaccination is the route of vaccination and time of vaccination which can contribute to a more effective immune response. Oral vaccination which is commonly used will be compared to spray vaccination and in ovo vaccination. Vaccine routes will be compared for their general efficacy (immunogenicity) with a focus on local mucosal immunity in lung and intestine. This local immunity, and how the most effective response can be obtained is of great importance, because the mucosa in lung and intestine form often the primary barrier to invading pathogens.

In-ovo vaccination has several advantages, e.g. reliable and accurate delivery, minimal handling of chicken and less labour-intensive combined with early onset of immunity. The induction of local mucosal immunity in lung and intestine has not been investigated yet and will be compared to oral and spray vaccination on day of hatch or around 16 days after hatch.

Within the EU programme the PG will perform one vaccination study which will initially start with one animal experiment. But more experiments (up to 3) can be needed to address the specific research question.

Induction of mucosal response/ immunity after in ovo vaccine compared to oral and spray vaccine administration directly after hatch in chicken

The mucosal response in the respiratory tract and intestinal tract after in ovo vaccination with *Eimeria* antigens in comparison with *Eimeria* live vaccines will be studied in chicken and compared to responses obtained after vaccination directly after hatch or around 16 days after hatch by spray or oral route. The immune responses in the mucosal surface (lung and intestine) will be analyzed at several time points after vaccination to measure initial response of the vaccine in the mucosal side. The early immune response will be measured, so initially there will be no challenge with a pathogen. In the end additional challenge can be needed to measure vaccine efficacy and immunogenicity.

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

Vaccination

- Oral vaccination: 0.5 ml of vaccine fluid will be orally inoculated
- Spray vaccination in a manual system. The droplet size will be calculated accordingly to the nozzle type and air pressure used in the system
- In ovo vaccination: vaccine mixture into the large end of each egg through with a fine needle
- Vaccination is needed to conduct the experiment (purpose of experiment)

Blood sampling

- Blood will be extracted at various time points in the procedure from the brachial wing vein
- The extracted volume will never exceed 8ml/kg body weight within 2 weeks (according to Handboek Proefdierkunde, vijfde druk)
- Repeated blood sampling is needed to evaluate the efficacy of the vaccination at different time points in the experiment

Challenge with pathogen

- Inoculation of *Eimeria* (sporulated oocysts) in oral cavity (max. 0.5 ml fluid)
- Challenge is needed to measure efficacy of the vaccine

Euthanasia

Cervical dislocation

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

Extensive literature review has been conducted to evaluate the number of used animals and the expected differences in the investigated immune parameters (leucocytes (including phenotyping), cytokines and chemokines) in comparable experiments. These expected difference in parameters (20-50%) together with the expected relative standard deviation, statistical power of 80% were used in a statistical computer programme (R studio) to calculate the expected minimal number of needed animals for significant study results. In the end the different groups of the experiment will be compared with a Student-t-test or ANOVA with a significant result for $P < 0.05$.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

One day old commercial Cobb-Vantress chickens provided by a commercial breeder who is a partner of the EU project. This specific breed is one of the commonly used chickens in the poultry industry. The estimated number is 120 chickens which will be all male or female to minimize the variation (standardization).

Additional 40 chicks will be used which have been vaccinated in ovo on day 18 after fertilization (18ED). For standardization these chicks will be male or female.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

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'?

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: For the measurement of the initial response of the vaccination and the immune responses the use of the target animal (chicken) is needed. The complex interaction between host, vaccination and immunity of target animal cannot be replaced by a model in which no animals are used.

Reduction: a thorough literature review had been conducted to see if no unnecessary experiments will be performed and to get an overview in the number of animals needed to get statistically significant results. A close estimation of the number of animals needed has also been calculated with a statistic computer program based on the expected difference in the used parameters and the relative standard deviation and needed statistical power.

Within the EU programme there is a close collaboration with the different partners resulting in combined experiments with multiple research question reducing the needed number of experiments.

Refinement: the animals will be accommodated according to European guidelines with extra attention for the size of the groups, optimal feeding and drinking and stable climate.

The animals will be monitored daily and multiple times a day during critical periods of the experiment or during veterinary emergency.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

The described procedures in 2A cause minimal pain and fear for the animals. For the blood sampling and vaccination no measures will be taken to minimize the pain and fear. Adverse effects on the environment will be not expected.

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 described experiments has not previously been performed based on review of published articles.

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 of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

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?

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.

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

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

The possible pain experience during blood sampling is minimal and no pain relief method is needed.

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?

The animals may experience mild to moderate intestinal problems after the challenge and less likely after vaccination (the vaccine is composed of a low dose of *Emeria oocyst*).

Explain why these effects may emerge.

The challenge with the pathogen causes moderate intestinal illness which will be closely monitored. Although it is unlikely that vaccination will cause illness, there will always be individual variability and animal can be affected and show clinical illness.

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

Vaccinated animals will be closely and daily monitored for illness. The following parameters will be measured daily (general impression (activity), respiration rate, food consumption). In case of illness and discomfort responsible veterinarian will be consulted and with severe illness and suffering (human endpoint) the animal will be euthanized.

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.

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

- Severe respiratory distress
- Severe paresis or paralysis
- According to Good Veterinary Practice

Indicate the likely incidence.

The incidence is unlikely.

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').

Blood sampling- mild

Vaccination-mild
Euthanasia- mild
Challenge with pathogen in non-vaccinated animals- moderate
Overall discomfort- moderate

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The extensive sampling of variable tissues cannot be combined with recovery after the procedure and euthanasia is needed to prevent severe discomfort.

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

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

Yes



[Redacted]

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Geachte CCD,

Onderstaand het advies dat de DEC-WUR heeft gegeven aangaande het project "Improvement of Animal health and Production by Innovative Vaccination Strategies"

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD401002015356**
2. Titel van het project: Improvement of Animal health and Production by Innovative Vaccination Strategies
3. Titel van de NTS: Verbetering van Gezondheid en Productie in Veehouderij door Optimale Vaccinatie
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
DEC-WUR
[Redacted]
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 28-12-2015 (23-12-2015 al door CCD verstuurd maar niet aangekomen)
Aanvraag compleet: 28-12-2015
In vergadering besproken: 18-01-2016

Dierexperimenten
Commissie WUR

DATUM
27 januari 2016

ONDERWERP
aanvraag projectvergunning
AVD401002015356

ONS KENMERK
AVD401002015356

[Redacted]

[Redacted]

INTERNET
www.wageningenUR.nl

KVK NUMMER
09098104

CONTACTPERSOON
[Redacted]

TELEFOON
[Redacted]

E-MAIL
[Redacted]

7. Correspondentie met de aanvrager

Datum vragen: 19-01-2016

Strekking van de vragen:

- Redactionele verbeteringen
- De DEC heeft vragen gesteld over:
 - Het gebruik van de patches

Datum antwoorden: 21-01-2016

Strekking van de antwoorden:

- De voorgestelde redactionele aanpassingen zijn overgenomen door de onderzoeker
- op vragen van de DEC:
 - De patches worden op onbehaarde of onthaarde huid gebruik en blijven ca. 24 uur zitten.

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 hoofdoelstelling.
3. Het substantiële belang van het project, te weten een effectievere vaccinatie van dieren waardoor uiteindelijk indirect een bijdrage geleverd kan worden aan verminderd antibioticagebruik en minder resistente bacteriën, 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 "moderate" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit bloedafname, vaccinatie, challenge en ziekteverschijnselen a.g.v. de challenge
7. De DEC heeft vastgesteld dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. De complexe interactie tussen ziektekiem, vaccinatie en afweer kan niet anders dan *in vivo* onderzocht worden.
8. De DEC heeft vastgesteld dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Veiligheid en effectiviteit worden in eerste instantie op celweek getest alvorens de vaccins in het dier worden getest. De aanvrager beschikt over voldoende expertise om te voorkomen dat eerder gedaan onderzoek herhaald wordt. Ook zijn literatuuronderzoek en statistische analyse uitgevoerd om het aantal dieren zo beperkt mogelijk te houden.
9. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De huisvesting en verzorging van de dieren voldoen aan de eisen die de wet stelt. Hoewel de proefopzet daar geen aanleiding voor geeft zijn HEP's gedefinieerd. 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.

DATUM
27 januari 2016

ONS KENMERK
AVD401002015356

PAGINA
3 van 3

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 het verkrijgen van beter weerbare en gezondere dieren en daarmee uiteindelijk aan terugdringen 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,





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

████████████████████
Postbus 59
6708 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
AVD401002015356
Bijlagen
2

Datum 23 december 2015
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ██████████
Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 21 december 2015.
Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD401002015356. 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:

KvK-nummer: 9098104

Straat en huisnummer: Akkermaalsbos 12

Postbus: 59

Postcode en plaats: 6708 AB WAGENINGEN

IBAN: NL10RABO0397066465

Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Wageningen UR

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie:

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? 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 maart 2016
Geplande einddatum: 31 december 2019
Titel project: Improvement of Animal Health and Production by Innovative Vaccination Strategies
Titel niet-technische samenvatting: Verbetering van Gezondheid en Productie in Veehouderij door Optimale Vaccinatie
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: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Postbus 59

6708 AB WAGENINGEN UR



**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
AVD401002015356

Bijlagen

2

Datum 23 december 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 23 december 2015

Vervaldatum: 22 januari 2016

Factuurnummer: 15700356

Ordernummer: WUR921840

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD401002015356	€ 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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek

██████████
Postbus 59
6700AW Wageningen
██

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centrale
commissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002015356

Uw referentie

Bijlagen
1

Datum 2 februari 2016
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte ██████████

Op 21 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Improvement of Animal health and Production by Innovative Vaccination Strategies" met aanvraagnummer AVD401002015356. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

- 1) In uw projectvoorstel beschrijft u drie verschillende focusgebieden. Een opsomming van de concrete doelstellingen/onderzoeksvragen ontbreekt echter. Aangezien de CCD de doelstellingen, het belang van de doelstellingen en de haalbaarheid van de doelstellingen moet meenemen bij de ethische afweging, is het van belang dat de specifieke doelstellingen van uw project volkomen helder zijn.
 - U wordt verzocht aan te geven wat het directe doel is van het project waarvoor een vergunning wordt aangevraagd.
 - U wordt verzocht een overzicht te geven van de belangrijkste onderzoeksvragen.
 - Daarnaast wordt u verzocht te onderbouwen op welke wijze de verschillende onderzoeksvragen samenhangen en wat de relatie met het directe doel is.
- 2) In uw aanvraag beschrijft u enerzijds nieuwe vaccins tegen drie verschillende ziektes, twee in varkens en een in kippen te willen ontwikkelen, en anderzijds drie onderzoek focus te hebben. Het is voor ons niet duidelijk wat de samenhang tussen deze drie vaccins is, behalve dat ze binnen dezelfde EU programma onderzocht worden. In het kader van de toetsbare eenheid verzoeken we om uit te leggen hoe de vaccins met elkaar samenhangen, waarom zijn alle proeven nodig om de doelstelling te bereiken, en waarom ze niet als zelfstandige projecten kunnen (per vaccin of per focus).

3) U beschrijft in uw aanvraag drie dierproeven te willen uitvoeren. Het is voor ons niet duidelijk wat de volgorde van de dierproeven is, of ze op elkaar volgen of in parallel worden gedaan, en of er go/no-go of beslismomenten in de experimentele opzet opgenomen zijn. In het kader van vermindering en verfijning verzoeken we u om duidelijk go/no-go of beslismomenten tussen de dierproeven en binnen de dierproeven, en de criteria waarop gekozen wordt een vervolgstap wel of niet uit te voeren duidelijk en uitgebreid te beschrijven.

Datum

2 februari 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD401002015356

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Gebruik hierbij het formulier dat u bij deze brief krijgt indien u uw antwoord per post verstuurt.

Om u aanvraag in de eerstkomende CCD vergadering te kunnen bespreken ontvangen we graag uw antwoord uiterlijk **dinsdag 9 februari 2016**.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen

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



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.
- | | |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- | | | |
|--------------|---|------|
| Naam | | |
| Datum | - | - 20 |
| Handtekening | | |
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Datum 8 februari 2016
Betreft Aanvulling aanvraag projectvergunning dierproeven
Aanvraagnummer AVD401002015356
Project "Improvement of Animal Health and Production by Innovative Vaccination Strategies"

Geachte CCD,

Wij beseffen de complexiteit van onze projectaanvraag met meerdere dierproeven en betreuren het dat wij niet erin zijn geslaagd om dit voldoende duidelijk te verwoorden. Graag willen wij in dit aanvullende document uw vragen beantwoorden en hopen dat deze aanvullende informatie duidelijk genoeg is om tot een weloverwogen oordeel te kunnen komen. Na telefonisch overleg op 2 februari hebben wij besloten om in een aanvullend document in het Nederlands de vragen te beantwoorden. Om de vragen zo overzichtelijk mogelijk te beantwoorden, herhalen wij in dit document eerste de gestelde vraag, waarbij we de sleutel woorden onderstrepen en deze woorden in het antwoord laten terugkomen.

Vraag 1

1) In uw projectvoorstel beschrijft u drie verschillende focusgebieden. Een opsomming van de concrete doelstellingen/onderzoeksvragen ontbreekt echter. Aangezien de CCD de doelstellingen, het belang van de doelstellingen en de haalbaarheid van de doelstellingen moet meenemen bij de ethische afweging, is het van belang dat de specifieke doelstellingen van uw project volkomen helder zijn.

-U wordt verzocht aan te geven wat het **directe doel is van het project** waarvoor een vergunning wordt aangevraagd.

-U wordt verzocht **een overzicht te geven van de belangrijkste onderzoeksvragen.**

-Daarnaast wordt u verzocht te onderbouwen op welke wijze de verschillende onderzoeksvragen **samenhangen en wat de relatie met het directe doel is.**

Antwoord vraag 1

Wij hebben in het projectvoorstel onder 3.1 geprobeerd de samenhang van ons project in de context van onze samenwerking binnen het EU programma te schetsen. Hier willen wij duidelijk maken, dat ons instituut als onderdeel van dit EU programma in het projectvoorstel zowel uitvoerend is, omdat wij over de juiste faciliteiten en kennis beschikken, als ook eigen specifieke onderzoeksdoelen vervolgt.

In 3.2 zijn onze specifieke activiteiten en doelstellingen weergegeven. De directe doelstellingen in het projectvoorstel worden beschreven in de drie focusgebieden met bijpassende onderzoeksvragen, die allemaal terug te voeren zijn op **het directe doel** van het project: "optimale vaccinatie tegen belangrijke endemische pathogenen bij varken (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus* (PRRSV) en *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo)) en kip (*Eimeria* spp.)". Zoals in het voorstel weergegeven zijn een deel van de dierproeven onderdeel van een promotieonderzoek naar kennis en optimalisatie van vaccinatie van pasgeboren landbouwhuisdieren (varken en kip).

In focusgebied a) "New vaccine candidates" testen wij voor het EU programma nieuw ontwikkelde vaccin kandidaten voor een drietal bedrijfsgebonden dierziekten (PRRSV, M.hyo en Eimeria). De ontwikkeling van de betreffende vaccins gebeurt in andere partner instituten in het EU programma en onze activiteit en **onderzoeksvraag** is hier uitsluitend om de immunogeniteit en effectiviteit in het immunocompetente doeldier (kip en varken) te testen voor deze nieuwe vaccin kandidaten. Deze kennis is voor het EU programma ten aanzien van de effectiviteit van de nieuwe vaccins belangrijk. Dit onderzoek is voor ons instituut eveneens van belang om hiermee referentiewaardes te generen voor de onderzoeken naar de rol van nieuwe, beter geschikte administratieroutes van vaccins en de vaccinatie van neonaten in focus a) en c).

In focusgebied b) is onze directe doelstelling twee alternatieve administratieroutes te onderzoeken, namelijk de transcutane vaccinatie route m.b.v. pleisters bij varkens en de in ovo vaccinatie in kippen. Beide onderzoeken worden in aanvullende vorm ook bij partners binnen het EU programma

uitgevoerd. Onze **onderzoeksvraag** is om te onderzoeken of de vaccinatieroutes effectief zijn en welke immunologische mechanismen lokaal en systemisch een rol spelen bij de inductie van immuniteit via deze routes, waarbij de nadruk wordt gelegd op ontwikkeling van lokale en mucosale immuniteit in darmen en luchtwegen.

In focusgebied c) is onze directe doelstelling verdere kennisontwikkeling omtrent de immuunreactie in het pasgeboren, jonge dier, waarbij wij voor deze onderzoeken gebruik maken van de nieuwe vaccins, maar ook van de kennis die bij andere partners ten aanzien van de werking van adjuvantia, die gebaseerd zijn op combinatie van verschillende Toll Like receptoren (TLR) en nanotechnologie in volwassen dieren. **De onderzoeksvraag** voor deze focus is met name of de effectiviteit van de vaccinatie en met name het adjuvants gerelateerd kan worden aan de leeftijd van het dier.

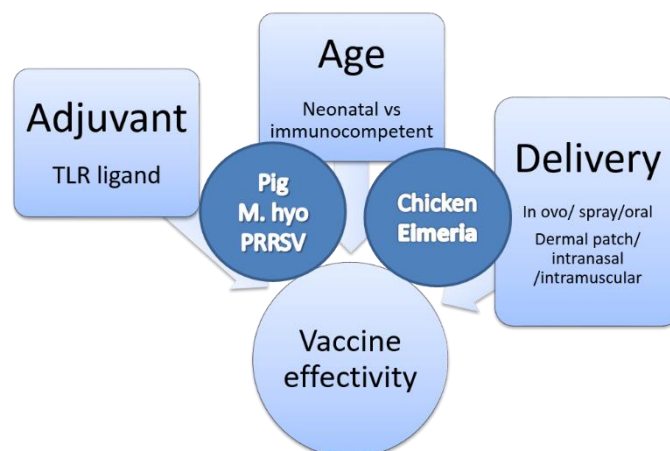
Vraag 2

In uw aanvraag beschrijft u enerzijds nieuwe vaccins tegen drie verschillende ziektes, twee in varkens en een in kippen te willen ontwikkelen, en anderzijds drie onderzoek focus te hebben. Het is voor ons niet duidelijk wat de **samenhang tussen deze drie vaccins** is, behalve dat ze binnen dezelfde EU programma onderzocht worden. In het kader van de toetsbare eenheid verzoeken we om uit te leggen hoe de vaccins met elkaar samenhangen, **waarom zijn alle proeven nodig** om de doelstelling te bereiken, en waarom ze niet als zelfstandige projecten kunnen (per vaccin of per focus).

Antwoord vraag 2

Het is gebruikelijk dat er een taakverdeling in EU projecten wordt gehandhaafd om hiermee vooral onderzoek te bespoedigen en onderdelen van onderzoek op die plekken te laten uitvoeren, waar de beschikbare expertise en faciliteiten zijn. Zoals boven al vermeld, zijn wij bij het testen van de nieuw ontwikkelde vaccins in eerste instantie de partner, die deze vaccins in het doeldier varken en kip gaat testen. Daarom is er op voorhand **geen directe samenhang** tussen deze drie vaccins, behalve het feit dat alle drie de vaccins worden onderzocht op effectiviteit met daarnaast de invloed van leeftijd en toedieningswijze (zie figuur 1). Echter voor onze doelstellingen ten aanzien van de rol van de administratieroutes (transcutaan, oraal, aerogeen of in-ovo) en de immuunreactie in de neonat zijn de gegevens uit de immunogeniteits/effectiviteitsstudies ter vergelijking van belang

Wij hebben bij het schrijven van het voorstel overwogen meerdere projectvoorstellen in te dienen, maar zijn tot de conclusie gekomen, dat dit geen recht zou doen aan het concept van het onderzoek.



Figuur 1

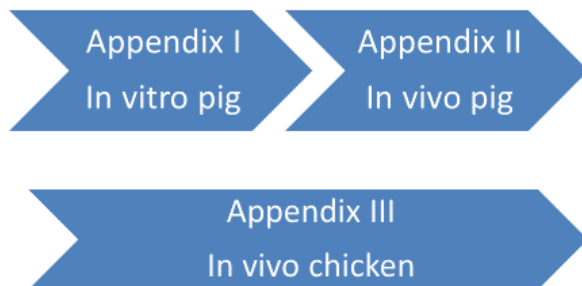
Vraag 3

U beschrijft in uw aanvraag drie dierproeven te willen uitvoeren. Het is voor ons niet duidelijk wat de volgorde van de dierproeven is, of ze op elkaar volgen of in parallel worden gedaan, en of er go/no-go of beslismomenten in de experimentele opzet opgenomen zijn. In het kader van vermindering en verfijning verzoeken we u om **duidelijk go/no-go of beslismomenten tussen de dierproeven en binnen de dierproeven**, en de criteria waarop gekozen wordt een vervolgstap wel of niet uit te voeren duidelijk en uitgebreid te beschrijven.

Antwoord vraag 3

In de aanvraag staan drie dierproeven beschreven. **De volgorde van de dierproeven** staat aangegeven in figuur 2. De dierproef beschreven in appendix 1 zal de eerste dierproef zijn, waarin dieren uitsluitend worden gebruikt als weefsel/bloeddonor en in vitro wordt gekeken naar de optimale leeftijd in combinatie met het meest geschikte adjuvant en toedieningswijze. De dierproef beschreven in appendix 2 zal pas volgen nadat de dierproef in appendix 1 is afgerond. De resultaten van de proef in appendix 1 alsmede resultaten, die behaald zijn bij andere partners in het EU programma zullen bepalend zijn voor de opzet van de dierproef in appendix 2. De dierproef in appendix 3 verloopt parallel met appendix 1 en 2, omdat dit een ander diersoort betreft.

Tussen de verschillende dierproeven (appendix I, II en III) zitten geen afhankelijkheden en zijn er **geen go/ no- go moment gedefinieerd**. Er is geen directe samenhang tussen de proeven in appendix (I en II) en appendix III (kip), daar het verschillende diersoorten betreft. Wel zullen de resultaten van de dierproef beschreven in appendix I (in vitro experiment) worden meegenomen in de opzet van de dierproef voor appendix II, waardoor mogelijk het aantal variabelen wordt verminderd. De opzet van de dierproeven in appendix I en II wordt voor een deel bepaald door de resultaten van dierproeven van andere partners binnen het EU project, die de vaccins en de TLR liganden leveren. De vaccins, die zullen worden gebruikt in appendix III om de verschillende toedieningsroutes te vergelijken zijn voor begin van de studie succesvol in dierstudies getest bij andere partners.



Figuur 2

In appendix 2 zijn drie verschillende proeven beschreven, waarbij in elke proef indien van toepassing een **go/no- go beslismoment** bestaat:

- Proef 1 betreft de effectiviteit van een nieuw PRRSV vaccin tegen een heterologe challenge met het PRRS virus. Deze proef wordt alleen uitgevoerd, indien studies bij een partner van het EU programma met een homologe challenge succesvol zijn afgerond.
- Proef 2 bevat een eerste studie, waarin het infectiemodel met een mycoplasma challenge opgezet wordt. Alleen als deze modelontwikkeling succesvol is, dwz. vergelijkbaar met in de literatuur beschreven modellen, zal een effectiviteitsstudie met nieuwe vaccins worden uitgevoerd. Anders zullen deze vaccins alleen ten aanzien van de immunogeniteit worden getest.
- Proef 3 omvat in eerste instantie studies, om het concept van transcutane vaccinatie in neonaten en immunocompetente varkens te analyseren en lokale en systemisch

immunologisch mechanismen te bestuderen na transcutane vaccinatie. Afhankelijk van de aangetoonde bescherming in proef 1 voor de nieuwe PRSS vaccins zal ook de bescherming met het in proef 1 geteste vaccin antigeen in studie 3 worden getest middels transcutane vaccinatie in neonatale en immunocompetente dieren

Wij hopen hiermee de bovenstaande vragen voldoende te hebben beantwoord. We begrijpen echter dat dit projectvoorstel met meerdere dierproeven complex is en willen dan ook graag eventuele onduidelijkheden mondeling toelichten.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Postbus 59
6708 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
AVD401002015356
Bijlagen
1

27 FEB 2016

Datum
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 "Improvement of Animal Health and Production by Innovative Vaccination Strategies" met aanvraagnummer AVD401002015356. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 8 februari 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft gereageerd op de vragen van de CCD. U heeft het doel geherformuleerd, u mening over de samenhang van de dierproeven toegelicht en extra informatie over de go/no-go momenten binnen uw experimentele opzet aangeleverd. We kunnen ons vinden in deze nadere aanvullingen van de aanvraag.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de algemen voorwaarden zoals genoemd in de vergunning wat voortvloeit uit artikel 10a, lid 1 van de wet. U kunt met uw project "Improvement of Animal Health and Production by Innovative Vaccination Strategies" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 maart 2016 tot en met 31 december 2019. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR gevoegd. 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. 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, aangevuld met de twee algemene voorwaarden zoals hierboven gemotiveerd. 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:


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: 6708 AB WAGENINGEN
Deelnemersnummer: 40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 01 maart 2016 tot en met 31 december 2019, voor het project "Improvement of Animal Health and Production by Innovative Vaccination Strategies" met aanvraagnummer AVD401002015356, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]
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 per digitale indiening op 21 december 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 december 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 27 januari 2016, ontvangen op 27 januari 2016.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 8 februari 2016

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Blood and tissue sampling for in vitro studies in pigs	Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>) / Beide geslachten	40	Licht / mild	
Mycoplasma hyopneumoniae (M.hyo) and Porcine Reproductive and Respiratory Virus (PRRSV) vaccination studies in pigs with challenge	Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>) / beide geslachten	200	Matig / moderate	Bloedafnamen-matig Vaccinatie- matig BAL- licht/matig Challenge- matig Cumulatief ongerief-matig Euthanasie -licht
Eimeria vaccination studies in chickens with or without challenge	Kippen / beide geslachten	160	Matig / moderate	Bloedafnamen- licht Vaccinatie- licht Challenge- matig Euthanasie-licht Cumulatief ongerief-matig

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 blijvende 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: maandag 22 februari 2016 15:57
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Beslissing aanvraag dierproeven
Bijlagen: Beslissing aanvraag dierproeven AVD401002015356.pdf

Geachte heer/mevrouw,

De brief wordt ook per post verstuurd.

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: 0900 280028

E: info@zbo-ccd.nl

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 23 februari 2016 10:47
Aan: DEC@wur.nl
Onderwerp: terugkoppeling aanvraag AVD401002015356

Geachte leden van de DEC WUR,

Op 27 januari 2016 heeft u advies uitgebracht op de projectaanvraag met titel 'Improvement of Animal Health and Production by Innovative Vaccination Strategies', en aanvraagnummer AVD401002015356. 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 CCD heeft de volgende vragen aan de aanvrager voorgelegd:

1) In uw projectvoorstel beschrijft u drie verschillende focusgebieden. Een opsomming van de concrete doelstellingen/onderzoeksvragen ontbreekt echter. Aangezien de CCD de doelstellingen, het belang van de doelstellingen en de haalbaarheid van de doelstellingen moet meenemen bij de ethische afweging, is het van belang dat de specifieke doelstellingen van uw project volkomen helder zijn.
 -U wordt verzocht aan te geven wat het directe doel is van het project waarvoor een vergunning wordt aangevraagd.
 -U wordt verzocht een overzicht te geven van de belangrijkste onderzoeksvragen.
 -Daarnaast wordt u verzocht te onderbouwen op welke wijze de verschillende onderzoeksvragen samenhangen en wat de relatie met het directe doel is.

2) In uw aanvraag beschrijft u enerzijds nieuwe vaccins tegen drie verschillende ziektes, twee in varkens en een in kippen te willen ontwikkelen, en anderzijds drie onderzoek focus te hebben. Het is voor ons niet duidelijk wat de samenhang tussen deze drie vaccins is, behalve dat ze binnen dezelfde EU programma onderzocht worden. In het kader van de toetsbare eenheid verzoeken we om uit te leggen hoe de vaccins met elkaar samenhangen, waarom zijn alle proeven nodig om de doelstelling te bereiken, en waarom ze niet als zelfstandige projecten kunnen (per vaccin of per focus).

3) U beschrijft in uw aanvraag drie dierproeven te willen uitvoeren. Het is voor ons niet duidelijk wat de volgorde van de dierproeven is, of ze op elkaar volgen of in parallel worden gedaan, en of er go/no-go of beslismomenten in de experimentele opzet opgenomen zijn. In het kader van vermindering en verfijning verzoeken we u om duidelijk go/no-go of beslismomenten tussen de dierproeven en binnen de dierproeven, en de criteria waarop gekozen wordt een vervolgstap wel of niet uit te voeren duidelijk en uitgebreid te beschrijven.

De aanvrager heeft voldoende beantwoord.

We hopen u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
 Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

24 DEC 2015



Centrale Commissie Dierproeven

1

AVD104002015357

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? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	10400
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Wageningen University
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
		KvK-nummer	9215846
		Straat en huisnummer	Akkermaalsbos 12
		Postbus	59
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Postcode en plaats	6700 AB Wageningen
		IBAN	NL10 RABO 0397066465
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> 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 | | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | | |
| Afdeling | | |
| Telefoonnummer | | |
| E-mailadres | | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- | |
|---|
| <input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> mee met deze aanvraag |
| <input checked="" type="checkbox"/> Nee |

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- | |
|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3 |
| <input type="checkbox"/> Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2 |
| <input type="checkbox"/> 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?
- | |
|--|
| <input type="checkbox"/> Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier |
| <input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 |
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- | |
|--|
| <input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 |
| <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6 |
|

 |

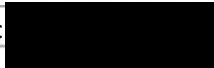
3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|----------------|
| Startdatum | 01 - 01 - 2016 |
| Einddatum | 31 - 12 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- | |
|--|
| Consequences of divergent selection for <i>natural antibodies</i> in chicken |
|--|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- | |
|--|
| Gevolgen van selectie voor hoge en lage <i>natuurlijke weerstand</i> in kippen |
|--|
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|----------------------------------|
| Naam DEC | DEC Wageningen University |
| Postadres | Postbus 9101, 6700 HB 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 en bijlagen beschrijving dierproeven (3x)
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging – mandaatbesluit 
-



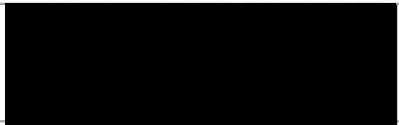
6 Ondertekening

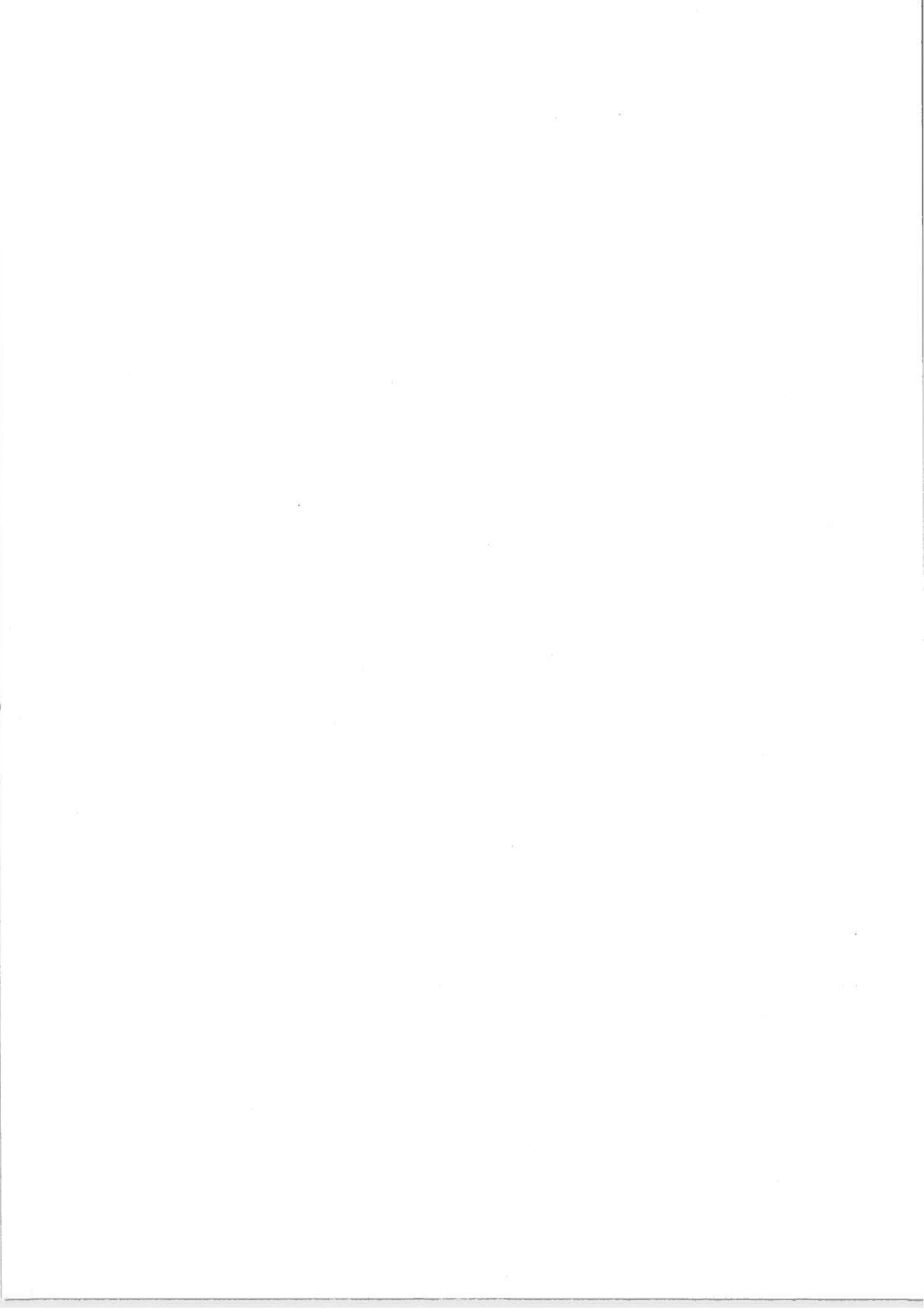
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

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 
 Functie 
 Plaats Wageningen
 Datum 23 - 12 - 2015
 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.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

- 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.

Belangrijke doelstellingen in de pluimveefokkerij zijn, naast een gebalanceerde toename in productie en

efficiëntie, het verkrijgen van dieren met een hogere resistentie tegen liefst meerdere ziektes (algemene ziekte resistentie) en het minimaliseren van microbiële contaminatie tussen dieren. Dit mede omdat gebruik van antibiotica beperkt is. Daarnaast heeft de (intensieve) pluimveehouderij een negatief imago in de maatschappij als gevolg van verminderd dierwelzijn en een relatief hoge, niet-gedefinieerde mortaliteit. Het fokken van kippen op een betere gezondheid is gecompliceerd, onder andere door afwezigheid van effectieve, eenvoudig-te-meten selectie criteria. Tot op heden heeft genetische selectie op immuniteit en immuun-gerelateerde kenmerken vooral geresulteerd in selectie op een verhoogde en vaak verbeterde adaptieve immuniteit (bijvoorbeeld specifieke antilichaamrespons) tegen specifieke antigenen/pathogenen. Echter dergelijke selectie is moeilijk toepasbaar door relatief hoge kosten en een relatieve lage opbrengst. Hierbij wordt ook vaak t.g.v. de selectie op de specifieke reactie slechts immuniteit verkregen tegen één pathogeen. Daarnaast evolueren microben sneller dan dieren en dierpopulaties zelf (als gevolg van natuurlijke mutatie of selectie) en zijn goedkope en effectieve vaccins voorhanden. Natuurlijke antilichamen (NAb) worden verondersteld te functioneren als een specifieke 'first line of defense' tegen virale en bacteriële infecties. Door hun relatief hoge niveaus en hun specificiteit (d.w.z. NAb binden meerdere niet-gerelateerde antigenen) remmen ze de entree en spreiding van infectieuze agens, zonder eerdere vaccinatie. Daarnaast bieden NAb tijd voor een ontwikkeling van de specifieke immuunrespons, kunnen NAb de *pool* vormen van waaruit specifieke antilichamen tijdens de infectie gerekruteerd worden en vormen NAb een essentiële link tussen het innate immuunsysteem en het adaptieve immuunsysteem. Een 'tekort' of gebrek aan NAb is (vooral bij de mens) ook gerelateerd aan een hogere kans op ontstekingsreacties, auto-immuniteit en/of metabole aandoeningen, omdat NAb verbindingen die ontsteking kunnen veroorzaken (endotoxines of celafvalproducten), kunnen wegvangen. Hoewel NAb bij alle geteste diersoorten zijn aangetroffen, is de exacte functie en regulatie bij de landbouwhuisdieren nauwelijks bekend.

Voor de kip zijn grote hoeveelheden NAb gericht tegen keyhole limpet hemocyanin (KLH) aangetoond. Anti-KLH NAb zijn eenvoudig en goed meetbaar vanaf 16 weken leeftijd. Eerdere studies hebben aangetoond dat:

- NAb-niveaus tegen KLH rond 16 weken erfelijk zijn ($h^2=0,12$).
- kippen met een hoog niveau aan NAb tegen KLH een verlaagd risico op sterfte hebben, gepaard met een verhoogde mate van immuunreactiviteit. Dit kan worden verklaard door de eerder genoemde functies die NAb hebben binnen het immuunsysteem.
- genetische correlaties aanwezig zijn tussen het niveau van NAb en genen die coderen voor andere belangrijke immuuncomponenten.

In 2013 is gestart met een STW-project, waarbij kippen divergent geselecteerd worden op hoge of lage niveaus van natuurlijke antilichamen gericht tegen het antigeen keyhole limpet hemocyanin (KLH) op zestien weken leeftijd. In een eerder experiment zagen we dat de twee NAb-selectielijnen immunologisch verschilden in hun reactie tegen verschillende andere modelantigenen. Daarnaast zagen we dat de lage NAb-selectielijn een veel hogere mortaliteit (2 keer hoger) vertoonde dan de hoge NAb-selectielijn na een intratracheale *E. coli*-infectie. In eerdere studies met NAb in kippen (overigens niet geselecteerd voor NAb) werden hoge NAb-niveaus geassocieerd met een hogere kans op overleving vergeleken met kippen met lage NAb-niveaus. Een positief effect van NAb op de 'natuurlijke ziekteresistentie' van kippen lijkt dus sterk aanwezig. Dit effect kan ook grotendeels verklaard worden op basis van bekende functies van NAb beschreven in (humane en murine) literatuur.

Voor toepassing van selectie op NAb in de dierhouderij (c.q. pluimveefokkerij), dient eerst meer informatie verkregen te worden over de selectie van kippen op basis van KLH-bindende NAb, evenals het effect van deze selectie op ziekteverwekkers en (andere) immunologische componenten. Dit projectvoorstel voorziet in een aantal proeven om meer inzicht te krijgen in de gevolgen en de toepasbaarheid van selectie voor NAb in pluimvee door vergelijking van selectielijnen. Vanaf generatie 5 kunnen we tevens de originele controlelijn (de purebred WA line van ISA) in de experimenten gebruiken. Alle beschreven dierproeven worden uitgevoerd op de NAb-selectielijnen en indien mogelijk op de controlelijn.

Samenvatting koepelaanvraag (DEC Wageningen referentie: 2014081):

Het directe doel van dit experiment is het fokken van kippen divergent geselecteerd op een hoog dan wel laag niveau van natuurlijke antilichamen (NAb) gericht tegen het antigeen keyhole limpet hemocyanin (KLH) op 16 weken leeftijd. De selectieprocedure is begonnen in 2013 en op het moment van indienen

van deze koepelaanvraag, zijn drie generaties gefokt. Het selecteren op NAb was in theorie mogelijk op grond van berekende erfelijkheidsgraden in diverse experimenten, maar is in de praktijk in dit project ook succesvol gebleken. Dit is voor ons reden om ook de vijf nog geplande generaties aan te vragen in deze koepelaanvraag. In het kader van het door STW gefinancierde project zal de mogelijkheid onderzocht worden of kippen divergent geselecteerd kunnen worden op NAb-niveaus tegen KLH, en wat de consequenties van deze selectie zijn voor ziekteresistentie en immunologische en fysiologische eigenschappen. Naar verwachting is generatie 5 nodig voor het volbrengen van het PhD-project, generatie 8 is nodig voor het volbrengen van het Postdoc-project (nog te starten). Deze koepelaanvraag wordt uitgevoerd tussen vanaf 01-03-2015 tot 31-12-2017. De individuele generatieaanvraag zal ongeveer elke 35 weken (lengte generatie-interval) gebeuren.

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?

Dit project heeft als doel meer inzicht te geven in:

- KLH-bindende NAb: Met zeer grote zekerheid kan worden gezegd dat kippen nooit KLH hebben 'gezien' en zullen 'zien' en met een zelfde zekerheid kunnen we dus stellen dat kippen dus daadwerkelijk natuurlijke antilichamen bezitten tegen KLH. Opmerkelijk is de grote hoeveelheid NAb tegen KLH, maar waarvan de oorzaak niet bekend is. Het is niet bekend welke componenten van KLH nu exact herkend worden. Met dit projectvoorstel willen we meer te inzicht krijgen in de actieve componenten (epitopen) van KLH en dus de actieve componenten op grond waarvan wij de selectie bepalen.
- Het gevolg van selectie op immunologische parameters, anders dan KLH-bindend NAb: Het selecteren voor hoge of lage niveaus van NAb heeft geleid tot twee kippenlijnen met sterk verschillende niveaus van NAb (ook tegen andere antigenen). Echter vanwege de complexiteit van het immuunsysteem, is het zeer waarschijnlijk dat de selectie ook effect heeft op andere componenten van het immuunsysteem. Zo zagen we na twee(!) selectiemomenten dat de NAb-selectielijnen verschilden in hun specifieke antilichaam-vorming als gevolg van immunisatie. Na verdere selectie (dus meerdere generaties) is een dergelijk effect naar verwachting sterker en zullen andere immunologisch componenten ook meer verschillen. Dergelijke effecten zijn ook waargenomen in een eerder selectie-experiment in kippen op basis van specifieke antilichamen tegen SRBC. De hoge SRBC-selectielijn had vergeleken met de lage SRBC-selectielijn een verhoogde concentratie van CD4+ T-cellen en (CD20+) B-cellen, verlaagde concentratie van CD8+ T-cellen en γ/δ T-cellen, een grotere milt en Bursa van Fabricius, een kleiner lichaamsgewicht, maar meer vet, hogere NAb-niveaus en een verhoogde (klassieke en alternatieve) complement reactiviteit. Deze verschillen leidden niet tot een verschil in een beschermd effect tegen de Ziekte van Marek (uitgelezen als mortaliteit). Hoewel effecten tussen de beide selectie-experimenten tot op zekere hoogte gelijk verwacht werden, blijkt in de praktijk dat de hoge NAb-selectielijn juist zwaarder is dan de lage NAb-selectielijn en dat de hoge NAb-selectielijn een lagere mortaliteit heeft dan de lage NAb-selectielijn als gevolg van een *E. coli*-infectie. Dit suggereert dat het NAb-selectie-experiment, waarin gefokt wordt op een belangrijk onderdeel van zowel het innate als het adaptieve immuunsysteem, duidelijk anders is dan het SRBC-selectie-experiment waarin gefokt werd op de humorale tak van het adaptieve immuunsysteem. Met dit projectvoorstel willen we meer inzicht krijgen in de gevolgen van KLH-bindende NAb-selectie op andere immunologische componenten.
- Het gevolg van selectie op *E. coli*-ziekeresistentie: Eerder zagen we dat de hoge NAb-selectielijn veel minder bevattelijk is voor *E. coli*-luchtweginfectie dan de lage NAb-selectielijn. Verdere karakterisering van ziekeresistentie is wenselijk om te bepalen hoe belangrijk de rol is van NAb in deze en andere infecties. Gedacht kan worden aan luchtweg- of darminfecties met een andere pathogeen dan de *E. coli*-bacterie. Maar gekozen is voor een zelfde *E. coli*-luchtweginfectie, maar nu met een lagere concentratie *E. coli*. Dit is meer gelijkend op een natuurlijk verloop van luchtweginfectie (slechts enkele ziekteverwekkers) t.o.v. het eerder uitgevoerde infectie-experiment waarbij zeer veel ziekteverwekkers werden ingebracht. Dit geeft tevens een bevestiging (ofwel een herhaling) van

eerder waargenomen resultaten. Het kiezen van een ander pathogeen heeft daarnaast als nadeel dat het model moet worden opgezet (uitvoeren pilotexperiment) en dat een dergelijk model ook beschikbaar moet zijn (aanwezigheid van een expert in Nederland).

De te gebruiken kippen zijn op relatief korte termijn beschikbaar: De dieren zijn onderdeel van het doorlopende selectie-experiment generatie vijf tot en met acht. Het generatie-interval is 35 weken. De meeste vragen kunnen worden onderzocht met de ouderdieren en/of de reserve-ouderdieren na het fokken van een nieuwe generatie. Op deze manier worden dieren (met licht ongerief) hergebruikt en reduceert dit het totaal aantal proefdieren.

3.3 Belang

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

Dit project dient de volgende wetenschappelijke belangen:

- kennis over het gevolg van de toegepaste selectie op NAb-niveaus.
- kennis over het gevolg van de toegepaste selectie op andere immunologische parameters.
- kennis van relaties tussen NAb-niveaus, morbiditeit, mortaliteit, infectieresistentie, specifieke immuunreacties (bijvoorbeeld tegen vaccins) en andere immunologische parameters.
- validatie van gen-regio's geassocieerd met NAb of andere immunologische parameters (bijvoorbeeld *E. coli*-resistentie).
- kennis over de immunologische en moleculaire kenmerken van KLH.

De kippen uit het selectie-experiment worden getypeerd voor NAb-niveaus tegen verschillende antigenen, voor NAb-niveaus op verschillende leeftijdsstadia en/of verschillende componenten van het KLH-molecuul (bijvoorbeeld de aanwezige suikergroepen). Daarnaast wordt gekeken naar specifieke antilichamen tegen modelantigenen en/of vaccintiters. Tot slot worden de kippen "immunologisch" gekarakteriseerd door bijvoorbeeld het kwantificeren van CD4+ en CD8+ T-cellen, B-cellen en complement activiteit. De selectielijnen worden tevens getest met een bekend pathogeen. Gekozen is voor *E. coli* op basis van relevantie van het pathogeen voor de pluimveehouderij, beschikbaarheid van het pathogeen (te verkrijgen via de GD) en geschiktheid van het pathogeen in relatie tot het beschermde effect van NAb. Slechts één pathogeen wordt getest binnen dit STW project vanwege tijdslimitatie. Ziekteresistentie tegen dit pathogeen is dus een *proof-of-principle*. Wellicht dat in de toekomst (na afronding van het project) wordt gekeken naar andere pathogenen. Bovendien worden de selectielijnen in een later stadium binnen dit project getest onder praktijkomstandigheden.

Dit project dient de volgende maatschappelijke belangen:

- nieuwe kennis voor de pluimveefokkerij, die gebruikt kan worden in selectie voor ziekteresistentie. Verkregen kennis kan ook worden toegepast voor de gehele veehouderij, hoewel recentelijk onderzoek heeft aangetoond dat NAb-niveaus in rundvee en vissen een voorspeller zijn voor een verhoogd risico voor gezondheidsproblemen en dus niet per se voorspellend zijn voor ziekteresistentie. Verschillende NAb vervullen wellicht verschillende functies waarvan binnen pluimvee, maar ook andere diersoorten nog weinig bekend is. Desalniettemin kan onderzoek aan de kippen-NAb-selectielijnen bijdragen aan de kennis over het belang van NAb bij andere diersoorten en bijdragen aan de kennis over de toe te passen selectiestrategie (fokken op hogere dan wel lagere NAb-niveaus).

Als daarnaast uit onderzoek blijkt dat selectie voor NAb-niveaus inderdaad toepasbaar is in de huidige veefokkerij, dan kan dat bijdragen aan:

- verminderde medicatie en antibiotica gebruik in de pluimveehouderij én gezondere kippen.
- gereduceerde kosten voor de pluimveehouderij en veiligere werkomstandigheden voor pluimveehouders en medewerkers.
- veiliger producten voor de consument.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

De ruggengraat van dit project is het al goedgekeurde NAb-selectie-experiment generatie vier tot en met acht. Na het fokken van een volgende generatie komen de ouderdieren (vijftig hanen en honderd hennen) en reserve-ouderdieren (vijftig hanen en vierhonderd hennen) beschikbaar voor het hier

aangevraagde project. Enerzijds kunnen de ouderdieren gebruikt worden voor (immunologische) karakterisering van de hoge en lage NAb-selectielijnen d.m.v. immunisatie of bloedafname voor ex vivo testen (celkarakterisering, complement assays, vaccintiters, etc.). Anderzijds kunnen de ouderdieren worden gebruikt voor het fokken van een extra generatie kippen ('schaduwgeneratie'), die gebruikt wordt in een proef. Deze 'schaduwgeneratie' ondergaat een (immunologische) behandeling, waardoor het immuunsysteem (en mogelijk NAb-niveaus) beïnvloed wordt. De proef zou dus de selectie kunnen beïnvloeden en daardoor is het niet mogelijk de proef uit te voeren in een generatie van het selectie-experiment zelf, maar alleen in een 'schaduwgeneratie'. De experimenten worden gecomplementeerd door het gebruik van de ISA controlelijn, die vanaf generatie 5 ook in eigen beheer is. De ISA controle lijn is de ouderlijn waaruit de hoge en lage NAb-selectielijnen zijn gefokt.

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 dit project zijn drie typen dierproeven nodig: "bloedafname kippen", "immunisatie kippen" en "infectie-experiment kippen". De eerste twee typen dierproeven geven meer inzicht in de immunologische veranderingen in de selectielijnen als gevolg van de selectie voor KLH-bindende NAb. Het derde type dierproef geeft meer inzicht in de ziekteresistentie in de selectielijnen als gevolg van de selectie voor KLH-bindende NAb.

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 fokken van een volgende generatie van de NAb-selectielijnen staat centraal in dit project. De kippen in het fokproces worden in geen geval gebruikt in een proef die tot verandering van de selectiekenmerken van de individuen en/of de nakomelingen kan leiden. Dit op grond van eerdere berekeningen die duiden op maternale transgenerationale effecten op NAb-niveaus, naast de "klassieke" overerving. Dit houdt concreet in dat bloedafname ("bloedafname kippen") mogelijk is gedurende ieder moment, maar dat immunisatie ("immunisatie kippen") of "infectie-experiment kippen" alleen mogelijk is na voldoende aanfok van een volgende generatie. Een exacte invulling van eventuele behandelingen of bepalingen in de dierproeven passend binnen de hierna beschreven type dierproeven wordt op een later moment besloten op basis van resultaten of ontwikkelingen. Desalniettemin staat de huidige planning van de dierproeven volledig uitgewerkt in deze aanvraag.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Bloedafname kippen
2	Immunisatie kippen
3	Infectie-experiment kippen
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.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10400	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Wageningen University	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Bloedafname kippen

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In de proef wordt bloed afgenomen ter immunologische karakterisering van de hoge en de lage NAb-selectielijnen en de controlelijn. Witte bloedcellen kunnen worden gebruikt voor karakterisering of om in kweek te zetten met bepaalde behandelingen en vervolgens genexpressie te meten. Daarnaast is histologisch onderzoek mogelijk op de (gekweekte) bloedcellen. Tevens kunnen diverse antilichaamconcentraties worden gemeten.

Primaire uitkomstparameters zijn onder andere antilichaamtiter, celconcentraties/celverhoudingen, genexpressie en complementactiviteit.

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.

Bloed wordt éénmaal van de betreffende kippen afgenomen. Bloedafname vindt plaats uit de vleugelvene. De procedure verloopt als volgt: kip wordt gevangen uit hok of kooi, gefixeerd, geprikt en weer vrij gelaten in het betreffende hok of kooi. De totale procedure duurt ongeveer één minuut. Het totale volume bloed dat wordt afgenomen bedraagt één tot 2,5 milliliter (afhankelijk van de test).

Een kip wordt dus maximaal één keer gebruikt voor een aanvullende test. Testen (en vraagstellingen) zullen zo veel mogelijk gecombineerd worden om het aantal proefdieren tot een minimum te beperken. De gehele populatie kan dus éénmaal extra bemonsterd worden. Dit wordt verondersteld als acceptabel hergebruik van de betreffende kippen, die eerder slechts gering of matig ongerief ondergingen.

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

Het aantal kippen dat nodig is per test is tien-vijftien per lijn. Dit is gebaseerd op statistische methoden (power = 0.8, significantie = 0.05). Op basis van ervaringen is dit aantal in de praktijk ook (bijna) altijd voldoende gebleken. Een biologisch relevante verschil is 1.5-twee titerpunten (= twee-drie keer zo veel

antilichamen). De spreiding (standaarddeviatie) binnen een normale kippenpopulatie is ongeveer 1.5.

B. De dieren

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

De kippen zijn afkomstig van eigen fok op de proefaccommodatie Carus, Wageningen University. Per lijn worden tien-vijftien kippen gebruikt (per test). De levensstadia hangen af van de specifieke vraagstelling, maar de relevantste periodes zijn rond zestien weken leeftijd (dit valt dan samen met het selectiecriterium) en rond de fokperiode op 32 weken leeftijd (dit geeft informatie over mogelijke transgenerationale effecten).

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.

De gebruikte kippen in deze dierproef zijn onderdeel van de hoge of lage NAb-selectielijnen of de controlelijn en hebben gering of matig ongerief ondervonden. Dit wordt verondersteld als acceptabel hergebruik van de betreffende kippen, die eerder slechts gering of matig ongerief ondergingen. Daarbij zijn de NAb-selectielijnen uniek in hun soort en is het niet mogelijk andere dieren te gebruiken dan deze lijnen.

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 welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging: Voor dit type selectie-experimenten zijn geen alternatieven bekend.

Vermindering: Het statistisch berekende en empirisch bevestigde aantal kippen is minimaal, doch voldoende om verschillen te detecteren.

Verfijning: De gebruikte kippen worden slechts éénmaal gebruikt voor deze additionele bepalingen. Daarnaast is de gebruikte grondhuisvesting (tot zestien weken) van de kippen is groter dan wettelijk voorgeschreven en heeft daarnaast diverse hokverrijking (zaagsel, zitstokken, speeltjes). De individuele huisvesting van de hanen is een 74 cm breed x 45 cm diep x 75 cm hoge kooi plus externe voerbak plus drinknippel met over de hele diepte een zitstok en een bak met zand (voor stofbaden). De individuele huisvesting van de hennen is een 36 cm breed x 45 cm diep x 50 cm hoge kooi plus externe voerbak plus drinknippel en over de hele diepte 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.

Voor deze proef zijn geen extra maatregelen getroffen, omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

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.

Voor zover bekend zijn waar ook ter wereld geen andere NAb-selectie-experimenten lopend (op basis van literatuur-afwezigheid in Pubmed en Google Scholar en kennis van experts op het gebied van immunogenetica in pluimvee).

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.

Het is aannemelijk dat in dit type experiment het toepassen van verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden meer ongerief met zich meebrengt dan dat dit ongerief wegneemt. Daarnaast is het gebruik van verdoving, pijnstilling en/of pijnverlichtingsmethoden mogelijk van invloed op de resultaten (effecten op cellen en verbindingen van het immuunsysteem).

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?

Stress als gevolg van de handeling met als mogelijk gevolg tijdelijke verminderde voer- en wateropname. Tijdelijke aanwezigheid van een hematoom na bloedafname.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het vangen en fixeren kan leiden tot gestrest zijn voor een beperkte tijd (maximaal twee dagen, meestal enkele minuten op basis van eigen waarnemingen).

Een hematoom is vaak het gevolg van een onverwachte beweging van de kip tijdens het bloedprikken, waardoor de ader scheurt.

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

De betreffende kippen worden met extra zorg geïnspecteerd tijdens de dagelijks controle.

In geval van een hematoom zal deze direct na het bloed afnemen, worden dichtgedrukt voor 10 seconden om de bloeding te stelpen.

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.

De bloedafname van de kippen is licht ongerief.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

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



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.	10400	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Wageningen University	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Immunisatie kippen

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Dit type dierproef bestaat uit twee experimenten (Experiment 2a en 2b).

Experiment 2a:

Deze proef heeft als doel meer inzicht te verkrijgen in de KLH-epitopen. KLH (keyhole limpet hemocyanin) is het zuurstof-transporterende molecuul van de zeeslak *Megathura crenulata*. KLH heeft een moleculaire massa variërend tussen acht en 32 MD. Het is een glycoproteïne en bestaat uit functionele units van ongeveer 50 kD met hoge aanwezigheid van glycanen (suikers). Glycanen zijn zogenaamde pathogeen geassocieerde moleculaire structuren (PAMP). Dit zijn conservatieve structuren, die sterk immuunstimulerend werken vooral op cellen van het innate immuunsysteem, maar ook B-cellen hebben dergelijke PAMP-receptoren. Glycanen van zowel lichaamseigen als lichaamsvreemde oorsprong faciliteren herkenning en verwijdering van de glycanen en de daaraan gekoppelde componenten, zoals bacteriën en dode cellen. Van NAb is bekend dat deze sterke affiniteit vertonen voor onder meer glycanen. Het lijkt dan ook voor de hand liggend dat KLH-bindende NAb vooral binden aan de glycanen aanwezig in KLH.

De KLH-glycanen kunnen d.m.v. in-vitro-behandeling met PNGase van KLH worden 'afgeknipt'. Voor deze proef immuniseren we kippen met onbehandelde KLH (oKLH) en behandelde KLH (bKLH) (=zonder glycanen). Ex-vivo-werk op eerder verzamelde monsters van de NAb-selectielijnen laat zien dat kippen zwakker reageren tegen bKLH dan tegen oKLH en dat antilichamen dus vooral gericht zouden kunnen zijn tegen de aanwezige suikergroepen. Gezien de verwachte rol van deze glycanen in de binding van KLH en KLH-bindende NAb, verwachten we een zwakkere response op de behandelde KLH dan op de onbehandelde KLH ongeacht lijn-effecten. Dit geeft ons meer inzicht in het belang van glycanen op KLH bij de binding van NAb, maar geeft ook meer inzicht in het algemene belang van glycanen op andere structuren (bijvoorbeeld microbiota of lichaamseigen structuren), die een rol zouden kunnen spelen bij de vorming of activatie van NAb. Daarnaast worden voor dit experiment zowel de hoge en lage NAb-selectielijnkippen geïmmuniseerd,

omdat we lijnverschillen in responsiviteit tegen de verschillende behandelingen verwachten. Door selectie op KLH-bindende NAb is het mogelijk dat we niet alleen selecteren op veel NAb (hoge NAb-selectielijn) of weinig NAb (lage NAb-selectielijn), maar ook op herkenning (affiniteit) van KLH of KLH-structuren. We zouden dus kunnen selecteren op affiniteit van NAb tegen KLH-glycanen. Daarbij onderzoeken we de rol die de glycanen spelen in de vorming van immunologisch geheugen d.m.v. een tweede immunisatie. Glycanen kunnen d.m.v. immunisatie als specifieke antigeen werken voor de vorming van het immunologisch geheugen (tegen glycanen). Glycanen (in hun werking als PAMP) zijn daarnaast ook specifieke stimuli voor het zowel het innate als het adaptieve (B- en T-cellen) immuunsysteem via herkenning door 'innate' receptoren als CLEC7A (C-type lectin domain family 7 member A, ook bekend als Dectin-1) of CR3 (complement receptor 3) en kunnen dus specifiek werken voor de vorming van immunologisch geheugen. Dit geeft zowel inzicht in de functie van glycanen bij de activatie van het immuunsysteem, alsook inzicht in de lijnverschillen als gevolg van selectie.

De primaire uitkomstparameters van deze proef zijn inzicht in de herkenning van glycanen (in de vorm van glycoproteïnen) door NAb, hoe deze herkenning wordt beïnvloedt door selectie van kippen op NAb, hoe de verschillende NAb-niveaus van invloed zijn op deze herkenning en de rol van de glycaan-bindende NAb in de vorming van immunologisch geheugen.

Experiment 2b:

Deze proef heeft als doel meer inzicht te krijgen in de rol van NAb in het initiëren, ondersteunen en vormen van een adaptieve immunorespons en (immunologisch) geheugen. In een eerdere proef met de NAb-selectielijnen bleek dat de hoge NAb-selectielijn ook op latere leeftijd (ongeveer 34 weken) hogere NAb-niveaus had tegen diverse antigenen dan de lage NAb-selectielijn. Tevens had de hoge NAb-selectielijn een sterkere en sneller specifieke immunorespons dan de lage NAb-selectielijn na immunisatie (gemeten d.m.v. specifieke antilichaamniveaus (SpAb)).

Bij het meten van NAb-niveaus binnen de hoge of de lage NAb-selectielijn, worden soms twee pieken in een frequentieverdeling (histogram) waargenomen waar een normale verdeling (met één piek) wordt verwacht. Het suggereert dat de selectie voor KLH-bindende NAb wellicht niet specifiek is voor één selectie criterium, maar voor twee of meerdere (bijvoorbeeld het aantal B-cellen en de gevoeligheid van de B-cellen voor externe stimuli). Binnen de selectielijnen bestaat dus grote variatie en wellicht ook een verschil in het (specifieke) immuunsysteem. In deze proef wordt onderzocht of verschillende NAb-niveaus binnen één selectielijn een verschillende immunorespons opwekken binnen de lijnen. Dit geeft ons ook inzicht in de verschillen tussen de twee lijnen en hoe deze lijnen verschillen van de controlelijn.

De primaire uitkomstparameters zijn NAb-titers voorafgaand aan de immunisatie, SpAb titers tijdens de immunisatie, en genexpressie in miltcelkweek als indicatie voor geheugenvorming van het adaptieve immuunsysteem.

N.B. De milt bestaat uit grote hoeveelheden lymfocyten en is immunologisch dus zeer interessant.

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.

Experiment 2a:

Deze proef bevat vier behandelingen: hoge NAb-selectielijnkippen geïmmuniseerd met oKLH of bKLH en lage NAb-selectielijnkippen geïmmuniseerd met oKLH of bKLH. De behandeling wordt onder de huid toegediend op dag 0 en dag 35. Na de behandeling wordt wekelijks 1 mL bloed afgenomen uit de vleugelvene. Bloedafname vindt plaats voorafgaand aan de primaire behandeling en wekelijks tot en met acht weken na de primaire behandeling; dus het totale aantal bloedafnamemomenten is negen. Dit karakteriseert de primaire en secundaire antilichaamrespons tegen het toegediende antigeen.

De immunisatie verloopt als volgt: kip wordt gevangen uit hok, gefixeerd, onderhuids inbrengen van de behandeling en weer vrij laten in het betreffende hok. De totale procedure duurt ongeveer één minuut.

De bloedafname verloopt als volgt: kip wordt gevangen uit hok of kooi, gefixeerd, geprikt en weer vrij gelaten in het betreffende hok. De totale procedure duurt ongeveer één minuut.

Experiment 2b:

De populatie kippen binnen één lijn wordt opgedeeld in hoge, gemiddelde of lage NAb-niveaus. Per groep ontvangen de kippen één van de drie behandelingen: negatieve controle (fosfaat gebufferde fysiologische zoutoplossing: PBS), immunisatie met KLH of immunisatie met een ander modelantigen (bijvoorbeeld humaan serum albumine: HuSA). Gekozen is voor twee modelantigenen (en een placebo-controlebehandeling), waarvan één onderdeel is van het selectie criterium en de andere volledig los staat

van het selectie-experiment en voor zover bekend niet specifiek één onderdeel van het immuunsysteem activeert.

De kippen worden tweemaal geïmmuniseerd voor het opwekken van een primaire (dag 0) en secundaire (dag 35) specifieke immuunrespons. Wekelijks wordt bloed afgenomen vanaf de primaire immunisatie (dag 0) tot het einde van de proef (dag 70). Dit resulteert in elf bloedafnames. Aan het einde van de proef worden de kippen geëuthanaseerd en worden miltcellen geïsoleerd en in kweek gezet.

De immunisatie verloopt als volgt: kip wordt gevangen uit hok of kooi, gefixeerd zodanig dat de trachea openstaat, intratracheaal inbrengen van 0.5 mL behandeling (d.m.v. een kroppaald) en weer vrij laten in het betreffende hok. De totale procedure duurt ongeveer één minuut.

De bloedafname verloopt als volgt: kip wordt gevangen uit hok of kooi, gefixeerd, geprikt en weer vrij gelaten in het betreffende hok of de betreffende kooi. De totale procedure duurt ongeveer één minuut.

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

Het aantal kippen dat nodig is per proefgroep is tien. Dit is gebaseerd op statistische methoden (power = 0.8, significantie = 0.05). Op basis van ervaringen is dit aantal in de praktijk ook (bijna) altijd voldoende gebleken. Een biologisch relevante verschil is 1,5-twee titerpunten (= twee-drie keer zo veel antilichamen). De spreiding (standaarddeviatie) binnen een normale kippenpopulatie is ongeveer 1.5.

B. De dieren

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

Het totaal aantal kippen voor dit type experiment is tweehonderdentwintig kippen. De experimenten worden eenmalig uitgevoerd.

Experiment 2a:

De veertig kippen (bestaande uit de twee NAb-selectielijnen met twee behandelingsgroepen/lijn en tien kippen/behandelingsgroep) zijn afkomstig van eigen fok op de proefaccommodatie Carus, Wageningen University. Per behandeling worden tien hennen gebruikt. De hennen zijn geselecteerde moederdieren uit generatie vier die gebruikt worden voor de fok van generatie vijf. De kippen worden pas gebruikt na succesvol uitbroeden van generatie vijf-dieren.

Experiment 2b:

De honderdtachtig kippen (bestaande uit twee NAb-selectielijnen met drie groepen/lijn en tien kippen/lijngroep) zijn afkomstig van eigen fok op de proefaccommodatie Carus, Wageningen University. Per behandelingsgroep worden tien hennen gebruikt. De hennen zijn willekeurig geselecteerde kippen uit een van de generaties. De kippen worden pas gebruikt na succesvol uitbroeden van de volgende generatie kippen, rond 35 weken leeftijd. Dit omdat de hoge NAb-groep in de hoge NAb-selectielijn en de lage NAb-groep in de lage NAb-selectielijn geselecteerd zijn als moederdieren voor het fokken van de volgende generatie.

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.

De gebruikte kippen in deze dierproef zijn onderdeel van de hoge of lage NAb-selectielijnen of de controlelijn en hebben gering of matig ongerief ondervonden. Dit wordt verondersteld als acceptabel hergebruik van de betreffende kippen, die eerder slechts gering of matig ongerief ondervonden. Daarbij zijn de NAb-selectielijnen uniek in hun soort en is het niet mogelijk andere dieren te gebruiken dan deze lijnen.

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: Voor dit type selectie-experimenten zijn geen alternatieven bekend.

Vermindering: Het statistisch berekende en empirisch bevestigde aantal kippen is minimaal, doch voldoende om verschillen te detecteren.

Verfijning: De gebruikte grondhuisvesting van de kippen is groter dan wettelijk voorgeschreven en heeft daarnaast diverse hokverrijking (zaagsel, zitstokken, speeltjes).

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.

Diverse kooiverrijking wordt toegepast voor de kippen (zaagsel, zitstokken, speeltjes).

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.

Voor zover bekend zijn waar ook ter wereld geen andere NAb-selectie-experimenten lopend (op basis van literatuur-afwezigheid in Pubmed en Google Scholar en kennis van experts op het gebied van immunogenetica in pluimvee).

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.

Het is aannemelijk dat in dit type experiment het toepassen van verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden meer ongerief met zich meebrengt dan dat dit ongerief wegneemt. Daarnaast is het gebruik van verdoving, pijnstilling en/of pijnverlichtingsmethoden mogelijk van invloed op de resultaten (effecten op cellen en verbindingen van het immuunsysteem).

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?

Stress als gevolg van de handeling (immunisatie of bloedafname) met als mogelijk gevolg tijdelijke verminderde voer- en wateropname.

Tijdelijke aanwezigheid van een hematoom na bloedafname.

Pikkerij als gevolg van groepshuisvesting.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het vangen en fixeren kan leiden tot gestrest zijn voor een beperkte tijd (maximaal twee dagen, meestal enkele minuten op basis van eigen waarnemingen).

Een hematoom is vaak het gevolg van een onverwachte beweging van de kip tijdens het bloedprikken, waardoor de ader scheurt.

Pikkerij is relatief vaak voorkomend, schadelijk gedrag tussen hokgenoten. Een exacte achterliggende oorzaak is niet bekend, hoewel het deels genetisch bepaald is. Van de basislijn is bekend dat zij gevoelig zijn voor het ontwikkelen van pikkerij.

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

De betreffende kippen worden met extra zorg geïnspecteerd tijdens de dagelijks controle.

In geval van een hematoom zal deze direct na het bloed afnemen, worden dichtgedrukt voor 10 seconden om de bloeding te stelpen.

De maatregelen getroffen ter voorkoming dan wel minimalisering van pikkerij: het plaatsen van speeltjes (bos stro, bos touwen), het strooien van graan (eenmaal daags), aanwezigheid van een radio en het ophangen van gasbeton om snavels af te stompen. Eventueel kan nog gevarieerd worden in het moment en de sterkte van de gegeven prikkels. Indien sprake is van (ernstige) pikkerij, dan wordt de lichtintensiteit geminimaliseerd (maximaal 5 lux) en de lichtkleur wordt aangepast naar rood. Dit is een standaard maatregel in de pluimveehouderij. In geval van verenpikkerij wordt het (interne protocol) "Handelingsplan bij pikkerij" in werking gesteld. Dit voorziet in het behandelingen van gepikte kippen en tevens in het eventueel toepassen van HEP op de gepikte kippen.

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.

Intern protocol "Handelingsplan bij pikkerij": Bij constatering van een gewonde kip door pikkerij: behandelen met PBH en CTC spray. Noteren, met diernummer, in het welzijnsdagboek. Kip terugplaatsen in de groep. Kippen met droge wonden worden in principe in de groep gelaten. Bij kippen met een wond groter dan 1 cm of een diepe wond waarbij de onderliggende spieren zichtbaar zijn, geldt het volgende: de kippen worden tweemaal behandeld met de sprays. Als de wond op de derde dag nog steeds nat (en dus vers aangepikt) is, wordt de kip uit het hok verwijderd en in een apart hok gezet. Kippen met wonden waarbij de huid en de spierlaag is geperforeerd, en waarbij de onderliggende buikorganen zichtbaar zijn, worden direct geëuthanaseerd. Kippen die apart zijn gezet blijven controleren, en zo nodig behandelen met PBH en CTC spray. Bij algehele malaise van de kip, of continuering van de pikkerij in de nieuwe groep, wordt de kip in overleg met de onderzoekers alsnog worden geëuthanaseerd.

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

Het percentage kippen dat mogelijk ernstig gepikt wordt (met wondjes), is maximaal 5%.

K. Classificatie van ongerief

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

De immunisaties en bloedafnames van de kippen zijn licht ongerief.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Het doden van de kippen is niet essentieel voor deze proef. Echter de kippen zijn "immunologisch behandeld" en daardoor veranderd en kunnen daarom niet meer dienen voor ander (immunologisch) onderzoek. Optioneel kan wel nog gekeken worden naar het effect van immunisatie op gedragingen, maar dit valt buiten het doel van deze projectaanvraag.

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



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.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|----------------------------|
| 3 | Infectie-experiment kippen |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Deze proef geeft meer inzicht in hoeverre NAb een rol spelen in ziekteresistentie tegen bepaalde (opportunistische) infecties. Eerder door ons uitgevoerd onderzoeken suggereerden dat hogere NAb-niveaus bij legpluimvee samen gaan met een hogere overlevingskans van de legperiode en zorgen voor verlaagde mortaliteit op jonge leeftijd als gevolg van een luchtweginfectie met *E. coli*. In deze proef willen we de algemene ziekteresistentie meten van een hoger dan wel lager niveau van NAb (gericht tegen KLH) middels de twee NAb-selectielijnen die gekenmerkt worden door een onderling verschil in NAb-niveaus. De hypothese is dat de hoge NAb-selectielijn minder gevoelig zal zijn voor een infectie in de luchtwegen dan de lage NAb-selectielijn, mogelijk omdat NAb de penetratie of aanhechting van ziekteverwekkers in de luchtzakken hinderen, de spreiding van ziekteverwekkers in het lichaam van de kip hinderen, de vorming van polyserositis in de luchtzakken verminderen, dan wel endotoxines wegvangen. Daarbij testen we de maternale en paternale invloed op ziekteresistentie door het kruisen van hoge NAb-selectielijnhanen met lage NAb-selectielijnhennen (HxL) en van lage NAb-selectielijnhanen met hoge NAb-selectieihennen (LxH). Deze vier genetische verschillende groepen worden gecompleteerd door het gebruik van een controlelijn (WA purebred ISA line). De morbiditeitscores bestaan uit het scoren van *E. coli*-kolonies op de luchtzakken, het pericard en de lever. Daarnaast monitoren we de groei van de kippen en meten we het relatieve orgaangewicht aan het einde van de proef.

Schematisch overzicht dieren

Ouderdieren		Nakomelingen
Hanen	Hennen	
25 hoge lijn	X 50 hoge lijn	= hoge lijn
	50 lage lijn	= HxL
25 lage lijn	X 50 lage lijn	= lage lijn
	50 hoge lijn	= LxH
25 controlelijn	X 50 controlelijn	= controlelijn

Schematisch overzicht *E. coli*-concentraties

Alle concentraties *E. coli*-cultures worden/werden gemaakt vanuit overnacht-*E. coli*-cultures. Het aantal *E. coli*-CFUs (CFU = kolonie-vormende unit) in een dergelijke cultuur is ongeveer 1.0×10^9 /mL. Dit is een standaard dosis met een concentratie van 1.0×10^9 levende *E. coli* bacteriën per mL.

Verdunning	Experiment	CFU/mL	CFU per behandeling (0.2 mL)
Onverdund	Pilotexperiment	1.0×10^9	2.0×10^8
1:5	Infectie-experiment (CCD aanvraag 201521)	2.0×10^8	4.0×10^7
1:10	Pilotexperiment	1.0×10^8	2.0×10^7
1:50	Huidige CCD aanvraag	2.0×10^7	4.0×10^6
1:100	Pilotexperiment	1.0×10^7	2.0×10^6

In deze aanvraag wordt een vijftig maal verdunde *E. coli*-concentratie voorgesteld.

Hypotheses

Op basis van het eerder uitgevoerde pilotexperiment (diverse *E. coli*-concentraties in een pilotexperiment) en het eerder uitgevoerde infectie-experiment (lijnverschillen in mortaliteit) komen we tot de volgende drie hypothesen voor het hier voorgestelde experiment (lijnverschillen in morbiditeit als uitleesparameter voor ziekteresistentie):

1. De hoge NAb-selectielijn is resistenter dan de lage NAb-selectielijn. De controlelijn zit qua resistentie tussen de hoge NAb-selectielijn en de lage NAb-selectielijn. We verwachten een beschermend effect van hogere NAb-niveaus t.g.v. selectie op ziekteresistentie.
2. LxH-kippen hebben een hogere resistentie dan de HxL-kippen. De controlelijn zit qua resistentie tussen de hoge NAb-selectielijn en de lage NAb-selectielijn. We verwachten een additioneel maternaal effect op ziekteresistentie, maar geen additioneel paternaal effect. Eerder onderzoek laat zien dat maternale effecten aanwezig zijn op NAb-niveaus. Voor de hier voorgestelde proef betekent dat de LxH-kippen, kippen met een lage NAb-selectielijnvader met een hoge NAb-selectielijnmoeder, resistenter zijn dan HxL-kippen, kippen met een hoge NAb-selectielijnvader met een lage NAb-selectielijnmoeder. Dit verschil is het gevolg van hoge-NAb-selectielijn-maternale effecten, die een positief effect hebben op de LxH-kippen en ook als gevolg van lage-NAb-selectielijn-maternale effecten, die een negatief effect hebben op de HxL-kippen. De controlelijn heeft geen additionele maternale effecten als gevolg van willekeurige selectie en zit qua resistentie tussen de LxH-kippen en HxL-kippen in.
3. Overall verwachten we dat de rangschikking van gemiddelde morbiditeitsscores (als uitleesparameter voor ziekteresistentie) als volgt is (van meer resistent naar minder resistent): hoge NAb-selectielijn, LxH-kippen, controlelijn, HxL-kippen en lage NAb-selectielijn.

Primaire uitkomstparameters zijn informatie over ziekteresistentie als gevolg van NAb-selectie en de maternale en paternale invloed op de ziekteresistentie. De ziekteresistentie wordt gemeten als mortaliteit, morbiditeit en (orgaan-)gewichtverandering.

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.

Tweeduizendvijfhonderd eieren (eigen fok) worden uitgebroed voor het verkrijgen van een 'schaduwgeneratie'. Dit aantal is gebaseerd op het benodigde aantal kippen voor de behandelingsgroepen: in totaal honderd kippen per lijn per behandeling met een sekseverhouding van 1:1. De uitgekomen kippen worden gesekst en krijgen een kuikenmerk. De kippen worden verdeeld over zeven hokken.

Daarnaast worden twee hokken met vijf kippen in de proefruimte gezet als sentineldieren. Deze kippen

krijgen géén behandeling en worden aangehouden tot drie weken leeftijd.

Indien meer kippen per familie aanwezig zijn (naar verwachting ongeveer 900 kippen) dan het benodigde aantal, wordt dit overschot aan kippen aangehouden tot dag 7 in één hok. Op dag 7 worden alle kippen gewogen en worden deze kippen geëuthanaseerd d.m.v. decapitatie. Van de geëuthanaseerde kippen wordt post-mortem bloed afgenomen om de invloed van maternale antilichamen op de ziekteresistentie te meten. Gedurende het experiment ontvangen alle kippen geen vaccinaties, omdat vaccinaties de resultaten beïnvloeden.

De gefokte kippen worden verkregen uit de geselecteerde ouderdieren. Deze ouderdieren (75 hanen en tweehonderdvijftig hennen) worden na afloop van het fokken van een generatie nog vijf weken extra individueel gehuisvest tot uitkomst van de benodigde kippen voor de schaduwgeneratie. Voor het verkrijgen van de nakomelingen wordt het eerder opgestelde kruisingsschema voor het fokken van die generatie gebruikt. Hierdoor zijn de gebruikte hoge en lage NAb-selectielijn kippen in de schaduwgeneratie representatief voor de kippen in het selectie-experiment. Tevens stelt ons dit in staat om genetische informatie te gebruiken bij het analyseren van de resultaten. Voor het verkrijgen van de HxL-kippen en LxH-kippen wordt een extra kruisingsschema opgesteld. Hiervoor worden de geselecteerde hanen gebruikt met de individueel gehuisveste reservehennen van het selectie-experiment.

Naar aanleiding van resultaten uit een eerder pilotexperiment en een eerder uitgevoerd infectie-experiment worden twee behandelingen getest: PBS als sham/placebo-infectie (0.2 ml) en een behandeling met een *E. coli*-dosis in PBS (0.2 ml). Honderd kippen per lijn per dosis worden gebruikt, gebaseerd op de eerder waargenomen spreiding.

Op 8 dagen leeftijd worden de kippen intratracheaal geïnfecteerd met één van de behandelingen. De kippen worden één week gemonitord, waarna de proef wordt beëindigd. Monitoring vindt plaats iedere twee uur gedurende de eerste vier dagen (maar niet om 2:00 uur en 4:00 uur i.v.m. slaaperiode kippen) en iedere acht uur gedurende de laatste drie dagen (0:00 uur, 8:00 uur en 16:00 uur). Van alle kippen wordt gewicht bepaald op de dag van uitkomst, dag 7 (dag vóór de behandeling i.v.m. hoeveelheid werk), vier dagen na de behandeling en bij het beëindigen van de proef. Tevens wordt post-mortem bloed afgenomen voor additionele bloedbepalingen (bepaling van bijvoorbeeld natuurlijke antilichamen tegen KLH, antilichamen gericht tegen *E. coli*-antigen, acute fase-eiwitten). Daarnaast worden de kippen geopend om lutzakken, lever en pericard te scoren op *E. coli*-infectie (polyserositis) en worden Bursa, lever en milt gewogen.

Op jonge leeftijd (8 dagen) is het aannemelijk dat de bescherming van de kippen tegen een *E. coli*-infectie voor een groot deel mede bepaald wordt door de maternale antilichamen die via de moeder zijn doorgegeven. Om dit te bepalen is het noodzakelijk bloed (1 mL) af te nemen bij de ouderdieren na beëindiging van de raapperiode (en worden de op dat moment in het ei aanwezige maternale antilichamen gemeten).

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

Het uitgangspunt is dat de infectie (morbiditeitscore en verschil in orgaangrootte) tussen de lijnen met 50% wordt verminderd door een lijneffect. Volgens de binomiale verdeling zijn 94 kippen per groep nodig (eenzijdig getoetst) om een afname van infectie met een betrouwbaarheid van 95% en een onderscheidend vermogen van 80% te kunnen aantonen. Honderd kippen worden ingezet om eersteweeksmortaliteit (~3%) en eventueel verlies van kuikenmerken (~1%) op te vangen.

De extra aanfok van kippen is nodig, omdat we de proef gebalanceerd willen opzetten: 1:1 sekseratio. Dat betekent dat we 100 hanen en 100 hennen per lijn nodig hebben, bij voorkeur evenredig verdeeld over alle tomen (= 2 hanen en 2 hennen per toom). In het vorige *E. coli*-experiment hebben we gerekend op 8 uitgekomen kuikens per toom. 16% van de tomen voldeed niet aan de voorkeur om minimaal 2 hennen én 2 hanen te hebben. Dit is een acceptabele afwijking. Minder dan 8 kuikens per toom fokken zal het aantal tomen dat voldoet, naar beneden brengen en de relatieve inbreng van bepaalde tomen of een bepaalde sekse vergroten. Daardoor zouden de gefokte kuikens niet meer representatief zijn voor hun groep en zal de inbreng van bepaalde kippen van te grote invloed op de groepsprestatie.

8 kuikens per hen maal 250 hennen totaal is 2000 eieren. Met een hatchability van 80% is een inleg van 2500 eieren nodig. Dit betekent 10 eieren per hen.

B. De dieren

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

Duizend kippen (tot twee weken leeftijd) van vijf verschillende kruisingen zijn nodig voor dit experiment (alle uit eigen fok). Daarnaast wordt het surplus aan uitgekomen kippen (naar verwachting 900 kippen) aangehouden tot dag 7 voor maternale antilichaambepaling. Voor de in eigen beheer gefokte kippen zijn 75 hanen en tweehonderdvijftig hennen als ouderdieren (ongeveer 35 weken leeftijd) nodig.

Daarnaast worden tien (twee maal vijf) kippen aangehouden tot drie weken leeftijd als sentineldieren.

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.

De gebruikte ouderkippen in deze dierproef zijn onderdeel van de hoge of lage NAb-selectielijnen of de controlelijn en hebben gering of matig ongerief ondervonden. Dit wordt verondersteld als acceptabel hergebruik van de betreffende kippen, die eerder slechts gering of matig ongerief ondergingen. Daarbij zijn de NAb-selectielijnen uniek in hun soort en is het niet mogelijk andere kippen te gebruiken dan deze lijnen.

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 welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

In dit experiment wordt specifiek gekeken naar het effect van genetische selectie op een immunologische parameter (niveau van antistoffen gericht tegen KLH) op de weerstand tegen een belangrijke ziekteverwekker bij pluimvee.

Vervanging:

Aangezien het doel van het project is het verbeteren van de gezondheidsstatus van pluimvee middels de productie van antistoffen op basis van selectie, is een lagere diersoort, dan wel een in-vitro-bepaling geen bruikbare optie.

Verfijning:

Het type infectieus agens voldoet in grote mate aan de criteria van weerstand waaraan NAb een (a-)specifieke bijdrage kunnen leveren aan de weerstand. Tevens is dit model al getest in de NAB-selectielijnen en werden duidelijke verschillen gevonden in *E. coli*-mortaliteit tussen de selectielijnen. Nu wordt onderzocht of bij een 'meer realistische' *E. coli*-concentratie (d.w.z. een lagere concentratie) een verschil in morbiditeit wordt gevonden (er wordt geen/een lage mortaliteit verwacht op basis van het eerder uitgevoerde pilotexperiment). Een nog lagere *E. coli*-dosis is weliswaar realistischer, maar het is aannemelijk dat geen tot weinig verschillen in morbiditeitscore worden gevonden (op basis van pilotexperiment).

Naar ons beste weten zijn voor *E. coli*-infecties geen mildere modellen voorhanden; *E. coli*-vaccins zijn niet goed ontwikkeld. Bovendien zou een *E. coli*-vaccinatie, indien al mogelijk, lastig te onderscheiden zijn van het natuurlijk aanwezige niveau van *E. coli*. Dit *E. coli*-infectiemodel berust op een bij vleeskuikens getest en gevalideerd model met een specifieke *E. coli*-stam verantwoordelijk voor problemen bij pluimvee. Dit model werd eerder door ons succesvol getest in legkuikens, waarbij gelijke klinische waarnemingen werden gedaan in de geïnfecteerde kippen t.o.v. vleeskuikens. Andere infectiemodellen zijn minder geschikt of niet beschikbaar voor dit onderzoek. Veldvirussen zijn een te groot risico voor de omgeving. De immunreactie tegen virale vaccins wordt ook in de selectielijnen bepaald. Bovendien zijn vaccintiters niet per se identiek aan weerstand, omdat antistoffen ingeval van virusinfecties niet identiek hoeven te zijn aan een relevante immunrespons (bijvoorbeeld cytotoxische T-celreacties) en daarbij vaccindoses kunnen variëren per kip. Een eerder selectie experiment op specifieke antistoftiters tegen SRBC toonde aan dat zeer grote verschillen in specifieke antistoffen (ook tegen virale vaccins) niet leidde tot significante verschillen in weerstand tegen virale infecties. Daarbij veronderstellen we dat natuurlijke antistofniveaus voornamelijk een eerste barrière

vormen tegen infecties met bacteriën.

Vermindering:

Voor dit experiment is het uitgangspunt dat de acute sterfte laag blijft en vooral verschillen in morbiditeitscores worden gevonden. In een eerder pilotexperiment zagen we dat een lagere verdunning van de *E. coli*-cultuur een relatief grote variatie geeft. Dit experiment behoeft dus geen verschillende concentraties ziekteverwekkers, maar kan worden uitgevoerd met één concentratie waarvan het effect geschat kan worden.

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.

Tijdens de additionele fokperiode van deze proef zijn geen aanvullende maatregelen getroffen. De schaduwgeneratie wordt de eerste vier dagen na behandeling twee-uurlijks gecontroleerd (maar niet om 2:00 en 4:00 i.v.m. slaaperperiode kippen) en na vier dagen worden de kippen acht-uurlijks gecontroleerd. De controle bestaat uit een individuele controle op opvallend sterk lijden van de kippen: het niet meer in staat zijn om zelfstandig voedsel of water tot zich te nemen, verlamningsverschijnselen of ademhalingsmoeilijkheden en gesloten ogen als humaan eindpunt (zoals beschreven in de literatuur). Kippen die voldoen aan deze waarnemingen zullen uit de proef worden genomen (zie ook "J. Humane eindpunten"). Tevens zullen drinknippels met bakjes lager worden opgehangen achter in de hokken en acht-uurlijks worden gevuld, zodat zieke kippen makkelijker bij water kunnen. In het eerder uitgevoerde experiment bleek dat vooral zieke kippen achter in het hok zaten (d.w.z. zo ver mogelijk van de deur = stress).

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.

Voor zover bekend zijn waar ook ter wereld geen andere NAb-selectie-experimenten lopend (op basis van literatuur-afwezigheid in Pubmed en Google Scholar en kennis van experts op het gebied van immunogenetica in pluimvee).

Deze proef is eerder deels uitgevoerd met een tienmaal hogere concentratie *E. coli* (CCD aanvraag 201521). In die proef onderzochten we verschillen tussen de hoge NAb-selectielijn, de lage NAb-selectielijn en de controlelijnen m.b.t. mortaliteit. Deze hebben we aangetoond, maar een verschil in morbiditeitscores werd niet aangetoond (alle kippen waren maximaal geïnfecteerd).

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 hanen en de hennen worden vanaf ongeveer zestien weken leeftijd individueel gehuisvest conform de normale fokprocedure. Voor deze proef zijn geen additionele veranderingen in huisvesting noodzakelijk, maar de ouderdieren worden wel langer individueel gehuisvest. Dit is noodzakelijk om een representatieve generatie voor de hoge NAb-selectielijn, de lage NAb-selectielijn en de controlelijn te fokken, die vergelijkbaar is met generatie 6 (die eerder is uitgebroed met deze kippen). Daarnaast wordt d.m.v. KI voorkomen dat bepaalde kippen een groter aandeel hebben in een bepaalde lijn en daardoor resultaten beïnvloeden als gevolg van reproductiesucces en niet als gevolg van NAb-niveaus. Tot slot worden dezelfde hanen gebruikt voor het fokken van de NAb-selectielijn als voor het fokken van de HxL-kippen en LxH-kippen. Dit zou betekenen (in geval van groepshuisvesting) dat alle kippen bij elkaar zouden moeten zitten, waardoor onderscheid tussen de groepen niet meer mogelijk is. Tijdelijke groepshuisvesting van de kippen tussen de twee KI-periodes is niet mogelijk i.v.m. de te verwachte agressie bij de hanen en mogelijk verenpikken bij alle kippen. Daarnaast is het aannemelijk dat de overgang van batterijkooi naar

groepshuisvesting en van groepshuisvesting naar batterijkooi voor grote stress zorgt en daarbij zijn mogelijk effecten van huisvestingswisseling en stress niet (goed) bekend. In de hier voorgestelde proefopzet is dus mogelijk sprake van additionele nadelige effecten op het dierenwelzijn, maar er is geen sprake van opschaling van het ongerief voor de ouderdieren.

De gebruikte kippen bij de daadwerkelijk infectie (de nakomelingen) worden gehouden conform de richtlijnen.

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.

Het gebruik van verdoving, pijnstilling en/of pijnverlichtingsmethoden mogelijk van invloed op de resultaten (effecten op cellen en verbindingen van het immuunsysteem).

De kippen worden frequent gemonitord en indien nodig uit de proef genomen op basis van eerder gedefinieerde humane eindpunten, waardoor het onnodig lijden tot een minimum wordt beperkt.

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?

Stress als gevolg van de handeling (bloedafname bij de ouderdieren of immunisatie bij de schaduwgeneratie) met als mogelijk gevolg tijdelijke verminderde voer- en wateropname.

Tijdelijke aanwezigheid van een hematoom na bloedafname bij de ouderdieren.

Ziekteverschijnselen (koorts, gewichtsverlies, afwijkend gedrag, e.d.; zie ook "J. Humane eindpunten") na *E. coli*-behandeling bij de schaduwgeneratie.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het vangen en fixeren kan leiden tot gestrest zijn voor een beperkte tijd (maximaal twee dagen, meestal enkele minuten op basis van eigen waarnemingen).

Een hematoom is vaak het gevolg van een onverwachte beweging van de kip tijdens het bloedprikken, waardoor de ader scheurt.

Ziekteverschijnselen zijn als gevolg van de *E. coli*-besmetting. Zodra de besmetting aanslaat, zullen de ziekteverschijnselen zichtbaar worden. Ziekteverschijnselen zullen meer aanwezig zijn en sterker worden naar mate de *E. coli*-infectie zich manifesteert.

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

De betreffende kippen worden met extra zorg geïnspecteerd tijdens de dagelijks controle. In geval van een hematoom zal deze direct na het bloed afnemen, worden dichtgedrukt voor 10 seconden om de bloeding te stelpen.

De schaduwgeneratie wordt de eerste vier dagen na behandeling twee-uurlijks gecontroleerd (maar niet om 2:00 en 4:00 i.v.m. slaaperiode kippen) en na vier dagen worden de kippen acht-uurlijks gecontroleerd. De controle bestaat uit een individuele controle op opvallend sterk lijden van de kippen: het niet meer in staat zijn om zelfstandig voedsel of water tot zich te nemen, verlamningsverschijnselen of ademhalingsmoeilijkheden en gesloten ogen als humaan eindpunt (zoals beschreven in de literatuur). Kippen die voldoen aan deze waarnemingen zullen uit de proef worden genomen (zie ook "J. Humane eindpunten"). Tevens zullen drinknippels met bakjes lager worden opgehangen achter in de hokken en acht-uurlijks worden gevuld, zodat zieke kippen makkelijker bij water kunnen. In het eerder uitgevoerde experiment bleek dat vooral zieke kippen achter in het hok zaten (d.w.z. zo ver mogelijk van de deur = stress).

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.

In geval van ernstig lijden als gevolg van geen/te weinig voer- of wateropname of als gevolg van infectie, wordt de kip geëuthanaseerd.

De schaduwgeneratie wordt de eerste vier dagen na behandeling twee-uurlijks gecontroleerd (maar niet om 2:00 en 4:00 i.v.m. slaaperiode kippen) en na vier dagen worden de kippen acht-uurlijks gecontroleerd. De controle op humane eindpunten, zoals eerder uitgevoerd bij de vorige infectie-experimenten, bestaat uit een controle op opvallend sterk lijden van de kippen (zoals beschreven in de literatuur):

- het niet meer in staat zijn om zelfstandig voedsel of water tot zich te nemen,
- verlamningsverschijnselen of
- ademhalingsmoeilijkheden en gesloten ogen.

Kippen die voldoen aan minimaal twee van deze waarnemingen worden genoteerd. Indien deze kippen langer dan één dag deze verschijnselen continu vertonen, worden de kippen uit de proef genomen. Het eerder uitnemen van kippen (vóór het vertonen van alle verschijnselen of korter dan één dag met twee of meer verschijnselen) is niet gewenst, omdat juist de duur en manifestatie van de infectie de verwachte lijnverschillen geeft in morbiditeitsscore. Het eerder uitnemen van de kippen resulteert in het scheeftrekken van de resultaten en zorgt mogelijk voor het verkleinen dan wel uitblijven van verschillen. De intratracheale challenge (handeling) resulteert naar verwachting in gering ongerief. Het ontwikkelen van de *E. coli*-infectie gaat, naar mate de infectie zich manifesteert, gepaard met een toenemende mate van ongerief. Matig ongerief wordt verwacht als het dier ziek is, d.w.z. bovenstaande symptomen in een meer of mindere mate laat zien. Er is sprake van (oplopend) matig-ernstig ongerief indien het dier meerdere symptomen laat zien voor een aantal opeenvolgende controles. Ernstig ongerief is aanwezig (tot kort voor) het vaststellen van het bereiken van de humane eindpunten. Met grote zekerheid kan worden verwacht dat de maximale morbiditeitsscore bereikt wordt, als de kippen alle HEP-verschijnselen laten zien, dan wel twee of meer van deze verschijnselen langer dan een dag laten zien. Dit werd waargenomen in het eerder uitgevoerde infectie-experiment. Op dat moment kunnen de kippen uit de proef worden genomen, omdat langer lijden niet ethisch verantwoord is en daarnaast goed bruikbare observaties zijn genoteerd of worden genoteerd tijdens het aanvullende post-mortem onderzoek op een later tijdstip.

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

Maximaal 10%.

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.

Het ongerief voor alle ouderdieren is matig ongerief. Naar verwachting zullen geen kippen uit de ouderdierengroep worden genomen i.v.m. het beschreven ongerief. De hergebruikte kippen met matig ongerief, worden individueel gehuisvest voor vijf weken, worden vijf maal gebruikt voor KI en worden gebruikt voor eenmaal bloed afname.

Het ongerief van het surplus aan uitgekomen kippen wordt geschaald op licht ongerief. De kippen ondergaan twee weegmomenten.

Het ongerief van de met PBS-"geïnfecteerde" kippen wordt geschaald op licht ongerief. Naar verwachting zullen geen kippen uit de PBS-"geïnfecteerde"-diergroep worden genomen i.v.m. het beschreven ongerief. De kippen ondergaan vier weegmomenten en een intratracheale toediening met PBS.

Het ongerief van de met *E. coli*-geïnfecteerde kippen wordt geschaald op ernstig ongerief, maar zou in de praktijk lager kunnen uitvallen en/of kunnen variëren tussen licht tot ernstig ongerief (afhankelijk van de capaciteit van de kip om met de infectie om te gaan). Kippen worden mogelijk uit de proef gehaald volgens de gedefinieerde HEP, maar deze kippen ondergaan dan al ernstig ongerief. De kippen ondergaan vier weegmomenten en een intratracheale toediening met *E. coli*.

Na afloop van het experiment wordt het ongerief vastgelegd, geëvalueerd en gerapporteerd aan de IvD Wageningen. Indien nodig worden ook interne protocollen aangepast en/of geoptimaliseerd.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Het doden van de kippen is essentieel voor deze proef, omdat de organen gewogen en beoordeeld worden voor metingen m.b.t. morbiditeit.


Het is niet noodzakelijk de ouderdieren te doden en deze kunnen in een ander experiment worden hergebruikt.

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD104002015357
2. Titel van het project: Consequences of divergent selection for natural antibodies in chicken
3. Titel van de NTS: Gevolgen van selectie voor hoge en lage natuurlijke weerstand in kippen
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
DEC Wageningen-UR

6. Adviestraject
Dit project heeft een wat afwijkend traject doorlopen. Het is in eerste instantie rechtstreeks bij de DEC WUR ingediend. Daarna is het opnieuw bij via de CCD bij de DEC ingediend. De DEC heeft het van de CCD ontvangen op 30 december 2015. Het is tweemaal door de DEC besproken: op 14-12-2015 en op 18-01-2016. De indiening bij de CCD wordt als maatgevend beschouwd voor de te hanteren termijnen.
Aanvraag compleet: ja
Termijnonderbreking(en) van 20-01-2016 tot 25-01-2016:
Aanpassing aanvraag: 25-01-2016
Advies aan CCD: 02-02-2016
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
8. Correspondentie met de aanvrager
Datum vragen: resp. 19-12-2015 (n.a.v. aanmelding bij DEC WUR) en 20-01-2016 (n.a.v. aanmelding CCD)
Strekking van de vragen:
M.b.t. het projectvoorstel:
 - De meerwaarde van dit project t.o.v. een eerder uitgevoerd, vergelijkbaar project;
 - Toelichting op de concrete focus van het project/ het bredere perspectief van het project en over de vraag, hoe de gekozen opzet past in dit bredere perspectief;
 - Vraag m.b.t. kennis van literatuur m.b.t. bevindingen in vergelijkbaar onderzoek bij andere diersoorten en welke conclusies daaruit worden getrokken voor de projectopzet;
 - Een redactionele opmerking.M.b.t. de appendix 1:
 - Een redactionele opmerking m.b.t. verheldering van verwijzingen naar andere proeven en het toespitsen van de tekst op de voorliggende proef.M.b.t. Appendix 2:
 - Verheldering en argumentatie van de toegepaste behandelingen van de manier waarop met de gekozen proefopzet het beoogde doel wordt bereikt.
 - Een redactionele opmerking m.b.t. verheldering van verwijzingen naar andere proeven en het toespitsen van de tekst op de voorliggende proef;
 - Enkele tekstuele opmerkingen (ter correctie/ verheldering).

M.b.t. Appendix 3:

- Toelichting op de gekozen dosis van de Coli-cultuur in relatie tot het te verwachten resultaat en explicitering van een hypothese; .
- Toelichting op en verheldering van de noodzaak tot een afwijkende huisvesting;
- Nauwkeuriger beschrijving van de humane eindpunten (HEPs), mede in relatie tot het voorkomen van ernstig ongerief;
- Enkele tekstuele opmerkingen (ter correctie/ verheldering).

M.b.t. de niet-technische samenvatting:

- Enkele tekstuele opmerkingen (ter verheldering).

Datum antwoorden: 25-01-2016

De antwoorden hebben geleid tot adequate aanpassing van de aanvraag.

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project vergunningplichtig is (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag is een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over de aanvraag te adviseren vanuit het oogpunt van onafhankelijkheid, onpartijdigheid en beschikbare expertises.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: n.v.t.

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 doelcategorieën in overeenstemming zijn met de hoofddoelstellingen.
3. Het substantiële belang van het project wordt door de DEC onderschreven, gezien de gezondheidsimpact van de E.coli bij pluimvee en gegeven het feit, dat het veel voorkomt en er veel pluimvee wordt gehouden. Ook bij minder intensieve houderijsystemen komt het voor, is er gezondheidswinst te behalen. Als met genetische selectie kan worden bereikt, dat de weerstand verbetert kan dat grote implicaties hebben, mogelijk ook voor andere diersoorten, niet alleen voor wat betreft de gezondheid, maar ook voor antibioticagebruik en ontwikkeling van bacteriële resistentie.
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. Het wetenschappelijke doel is om informatie te vergaren over de relatie tussen natuurlijke antilichamen en E.Coli-(on)gevoeligheid. De betrokken onderzoeksgroep heeft veel ervaring met dit type onderzoek, waar het voorliggende project op voortbouwt. Bovendien is hiervoor een pilot uitgevoerd, waarvan de resultaten zijn gebruikt in deze opzet.
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: Er worden ouderdieren gebruikt uit een andere proef. T.b.v. voorliggend project moeten ze langer (dan nodig voor de oorspronkelijke proef) individueel worden gehuisvest. Dit wordt voldoende onderbouwd. In de hier voorgestelde proefopzet is dus mogelijk sprake van additionele nadelige effecten op het dierenwelzijn, maar er is geen sprake van opschaling van het ongerief voor de ouderdieren.
6. De DEC stelt vast dat het cumulatieve ongerief realistisch is ingeschat. De verwachte negatieve gevolgen variëren per type proef. In het algemeen zijn de negatieve gevolgen licht, bijvoorbeeld twee vaccinatieprikken en acht keer bloedafname. Dit kan leiden tot lichte pijn en stress met als mogelijk gevolg tijdelijke verminderde voer- en

wateropname, daarnaast mogelijk tijdelijke aanwezigheid van een hematoom na bloedafname. Bij het infectie-experiment zijn de negatieve gevolgen licht tot ernstig. Dit kan leiden tot het overlijden van de dieren als gevolg van de infectie, maar zal vooral zichtbaar zijn als malaise, pijn, stress, gewichtsverlies, mogelijk ook ademhalingsmoeilijkheden en verlamingsverschijnselen. Ook worden sommige kippen individueel gehouden wat stress met zich meebrengt, omdat de dieren niet veel afleiding hebben. Bij de dieren die in groepen worden gehouden kan sprake zijn van verenpikkerij.

7. De DEC heeft vastgesteld dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Het doel van het project is het verbeteren van de gezondheidsstatus van pluimvee middels de hogere productie van natuurlijke antistoffen op basis van selectie. De gebruikte kippen zijn onderdeel van een speciaal fokprogramma voor kippen met hoge of lage niveaus van natuurlijke antilichamen. Een lagere diersoort dan wel een in-vitro-bepaling is geen bruikbare optie.
8. De DEC heeft vastgesteld dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van gebruik van dieren voor dierproeven. Het statistisch berekende en empirisch bevestigde aantal kippen is minimaal, doch voldoende om verschillen te detecteren. Daarnaast is voor het bepalen van het aantal dieren voor de infectieproef gebruik gemaakt van de resultaten van een pilot, waaruit bleek dat het experiment kan worden uitgevoerd met één concentratie waarvan het effect geschat kan worden. 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 kippen, die worden gehuisvest in groepen, worden gehouden op zaagsel, met zitstokken en hebben beschikking over 'speeltjes' tegen eventuele verveling. Verenpikken wordt zoveel mogelijk voorkomen of behandeld. Daarnaast worden voor alle dieren altijd de beschreven humane eindpunten gehanteerd en wordt met extra zorg gecontroleerd als de dieren mogelijk ernstig gaan lijden. Alle hennen die alleen worden gehouden, hebben een buurvrouw die ze kunnen zien, horen, ruiken en aanraken. De meeste hanen die alleen worden gehouden, hebben een buurman die ze kunnen zien, horen, ruiken en aanraken. Sommige hanen hebben geen directe buurman, maar kunnen wel andere hanen zien, horen en ruiken. Daarbij hebben alle hanen een stofbad in de kooi om een stofbad te kunnen nemen. 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 unaniem 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 beter begrip van de selectie op natuurlijke antistoffen (bij de hoge en lage natuurlijke-antilichaamkippenlijnen) en de kennis over ziekteverstand, die direct kan worden toegepast door fokbedrijven. Op termijn kan dit bijdragen aan vermindering van antibioticagebruik en verbetering van de gezondheid en het welzijn van dieren en mensen. 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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen-Universiteit

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
AVD104002015357

Bijlagen

2

Datum 28 december 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 23 december 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD104002015357. 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 plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]

Functie: [REDACTED]

Afdeling: [REDACTED]

Telefoonnummer: [REDACTED]

E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? 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 2020
Titel project: Consequences of divergent selection for natural antibodies in chicken
Titel niet-technische samenvatting: Gevolgen van selectie voor hoge en lage natuurlijke weerstand in kippen
Naam DEC: DEC Wageningen University
Postadres DEC: Postbus 9101, 6700 HB 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: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam: [REDACTED]

Functie: [REDACTED]

Plaats: Wageningen

Datum: 23 december 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen-Universiteit

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
AVD104002015357

Bijlagen

2

Datum 28 december 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 28 december 2015

Vervaldatum: 27 januari 2016

Factuurnummer: 15700357

Ordernummer: WUR922946

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD104002015357	€ 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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen University

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
AVD104002015357

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
1

Datum 09 februari 2016

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 23 december hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Consequences of divergent selection for natural antibodies in chicken" met aanvraagnummer AVD104002015357. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

- 1) Wij begrijpen dat u in bijlage 1 en 3 zowel hanen als hennen gebruikt, terwijl u in bijlage 2 enkel hennen gebruikt. Kunt u bevestigen dat u in bijlage 1 en 3 beide geslachten gebruikt? En kunt u onderbouwen waarom u in bijlage 2 alleen hennen gebruikt?
- 2) Het aantal te gebruiken dieren in de NTS lijkt niet overeen te komen met het aantal te gebruiken dieren beschreven in de aanvraag.
- 3) Kunt u het totale aantal te gebruiken dieren in bijlage 1 verhelderen? U noemt een aantal van 10-15 dieren per test, maar niet hoeveel testen u zult uitvoeren.
- 4) U geeft aan dat de dieren worden hergebruikt, en in bijlage 3 mogelijk ernstig ongerief ondervinden. Bij vraag C heeft u echter aangegeven dat er geen sprake is van (of een risico van) ernstig ongerief. Kunt u dit consistent maken?

Overige opmerkingen

Het is ons niet volledig helder wat de handelingen zijn geweest met de dieren voordat ze in de onderliggende dierproef worden gebruikt. Mogelijk is hier geen sprake van hergebruik, indien de dieren voor identificatie/karakterisering slechts 1 ingreep nodig is (zie hiervoor het registratieboekje van de NVWA).

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Datum

09 februari 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD104002015357

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief 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. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn 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



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.
- | | |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- | | | |
|--------------|---|------|
| Naam | | |
| Datum | - | - 20 |
| Handtekening | | |
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag



Postbus 338 | 6700 AH Wageningen

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Geachte heer/mevrouw,

Hieronder vindt u mijn reactie op uw verzoek (d.d. 9 februari 2016) tot opheldering omtrent enkele onduidelijkheden in project "Consequences of divergent selection for natural antibodies in chicken" met aanvraagnummer AVD104002015357.

M.b.t. "Onduidelijkheden":

1) *Wij begrijpen dat u in bijlage 1 en 3 zowel hanen als hennen gebruikt, terwijl u in bijlage 2 enkel hennen gebruikt. Kunt u bevestigen dat u in bijlage 1 en 3 beide geslachten gebruikt? En kunt u onderbouwen waarom u in bijlage 2 alleen hennen gebruikt?*

Dit is correct. In bijlage 1 en bijlage 3 worden zowel hennen als hanen gebruikt. In bijlage 2 worden alleen hennen gebruikt.

De huidige structuur m.b.t. het fokken van de NAb-selectielijnen is dat de niet-geselecteerde hanen worden geëuthanaseerd na het selectiemoment (zestien weken leeftijd), omdat langer aanhouden van de dieren niet mogelijk is i.v.m. verwachte agressie in groepshuisvesting en omdat individuele huisvesting van alle hanen niet gewenst is. Alleen selectiehanen kunnen dus (individueel) aangehouden worden. De handelingen uit bijlage 1 kan op alle dieren worden uitgevoerd zonder consequenties voor het selectiecriterium en de fokprocedure. De handelingen, c.q. immunisaties, uit bijlage 2 daarentegen manipuleren het selectiecriterium en/of de fokprocedure en kunnen daardoor pas worden uitgevoerd na afloop van de fokperiode (vanaf ongeveer 35 weken leeftijd). Op die leeftijd is het niet mogelijk om hanen in groepshuisvesting aan te houden en is het ongewenst deze hanen langer individueel gehuisvest aan te houden. De hanen zijn daardoor niet bruikbaar voor het experiment uit bijlage 2. De beschreven dieren uit bijlage 3 zijn een 'extra' generatie dieren. De handeling, c.q. infectie, uit bijlage 3 beïnvloedt het selectiecriterium en/of de fokprocedure. Om deze reden kunnen niet de dieren uit de fokgeneratie zelf gebruikt worden, maar wordt een 'schaduwgeneratie' gefokt. Voor dit experiment wordt geen sekseverschil verwacht en kunnen dus zowel hanen als hennen gebruikt worden.

Het gebruik van alleen hennen in bijlage 2 volgt dus uit praktische redenen. Voor bijlage 1 en bijlage 3 kunnen beide sekse gebruikt worden, omdat hier geen verschil in wordt verwacht. Tevens halveert dit het aantal te gebruiken proefdieren.

DATUM

10 februari 2016

ONDERWERP

Reactie op "Aanvulling
Aanvraag projectvergunning
dierproeven"

UW KENMERK

Aanvraagnummer
AVD104002015357

ONS KENMERK

Aanvraagnummer
AVD104002015357 - Reply 1

■■■■■
■■■■■
■■■■■
■■■■■
■■■■■
■■■■■
■■■■■
■■■■■

INTERNET

www.wageningenUR.nl

KvK NUMMER

09098104

CONTACTPERSOON

■■■■■

TELEFOON

■■■■■

E-MAIL

■■■■■

DATUM
10 februari 2016

ONS KENMERK
Aanvraagnummer
AVD104002015357 - Reply
1

PAGINA
2 van 3

2) *Het aantal te gebruiken dieren in de NTS lijkt niet overeen te komen met het aantal te gebruiken dieren beschreven in de aanvraag.*

Hieronder wordt het aantal dieren per experiment weergegeven:

Bijlage	Aantal	Omschrijving
1	20-30 dieren per test	Volwassen dieren a.g.v. de reguliere selectie- en fokprocedure
2a	40 hennen	Geselecteerde hennen na afloop van de selectie- en fokprocedure
2b	180 hennen	Geselecteerde en niet-geselecteerde hennen na afloop van de selectie- en fokprocedure
3	75 hanen	Geselecteerde hanen voor additionele fokprocedure na afloop van de reguliere selectie- en fokprocedure
	250 hennen	Geselecteerde hennen voor additionele fokprocedure na afloop van de reguliere selectie- en fokprocedure
	1.000 dieren	Kuikens voor het infectie-experiment
	900 dieren	Surplus aan kuikens als gevolg van uitkomst
	10 dieren	Sentinel-kuikens voor het infectie-experiment

Het totaal aantal dieren komt uit op 2.905 indien uitgegaan wordt van 15 testen met 30 dieren (zie ook volgende vraag). U heeft correct opgemerkt dat het aantal dieren genoemd in de NTS niet overeenkomt met de aantallen genoemd in de aanvraag. Het aantal dieren in de NTS bevat een foutief, dubbel aantal dieren in het infectie-experiment. In de bijlage van deze brief vindt u de aangepaste NTS. Hierbij is het maximaal aantal dieren bijgesteld naar 3.000 dieren om extra marge aan te houden voor eventuele aanvullende testen onder bijlage 1 en een zeer goede uitkomst voor het infectie-experiment (resulterend in een groter aantal surplus aan kuikens).

3) *Kunt u het totale aantal te gebruiken dieren in bijlage 1 verhelderen? U noemt een aantal van 10-15 dieren per test, maar niet hoeveel testen u zult uitvoeren.*

Het maximaal aantal testen dat kan worden uitgevoerd is 75 testen (1.500 dieren per generatie gedeeld door 20 dieren per test). Naar verwachting zijn ongeveer 15 testen nodig (op bijvoorbeeld twee leeftijdsmomenten). Indien mogelijk worden testen zoveel mogelijk gecombineerd, zodat in totaal minder dieren gebruikt worden. Dit levert tevens additionele informatie op, omdat binnen een individu het immuunsysteem voor meerdere aspecten wordt gekarakteriseerd en gecombineerd. N.B. Dieren worden gebruikt voor één bloedafname. Een dier wordt dus niet gebruikt voor twee of meer herhaalde bloedafnames.

4) *U geeft aan dat de dieren worden hergebruikt, en in bijlage 3 mogelijk ernstig ongerief ondervinden. Bij vraag C heeft u echter aangegeven dat er geen sprake is van (of een risico van) ernstig ongerief. Kunt u dit consistent maken?*

Het hergebruik van dieren in bijlage 3 refereert naar de gebruikte ouderdieren. Deze ouderdieren ondervonden gering of matig ongerief. Deze ouderdieren worden niet gebruikt voor de daadwerkelijke infectie en dus is geen sprake van (kans op) ernstig ongerief.

Hieronder wordt de toelichting op ongerief in de aanvraag kort samengevat:

Vraag	Subvraag	Antwoord	Toelichting
C	Hergebruik?	Nee	Geen hergebruik voor de additioneel gefokte dieren die de daadwerkelijk behandeling ondergaan.
		Ja	Wel hergebruik voor de ouderdieren. Deze dieren zijn eerder gebruikt voor de reguliere selectie- en fokprocedure.
	Ernstig ongerief?	Nee	De hergebruikte ouderdieren ondergaan geen (kans op) ernstig ongerief.
K	Classificatie ongerief:	Matig	Ongerief voor de hergebruikte ouderdieren
		Licht	Ongerief voor het surplus aan kuikens
		Licht	Ongerief voor de kuikens met controlebehandeling
		Ernstig	Ongerief voor de kuikens met <i>E. coli</i> -behandeling

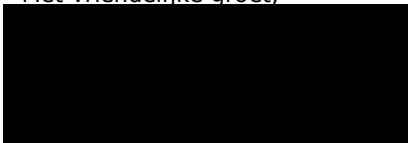
M.b.t. "Overige opmerkingen":

Het is ons niet volledig helder wat de handelingen zijn geweest met de dieren voordat ze in de onderliggende dierproef worden gebruikt. Mogelijk is hier geen sprake van hergebruik, indien de dieren voor identificatie/karakterisering slechts 1 ingreep nodig is (zie hiervoor het registratieboekje van de NVWA).

De dieren worden gebruikt voor het fokken op algemene ziekteresistentie. Kort samengevat ondergaan dieren minimaal twee en maximaal vier bloedafnames, wordt ongeveer 15% individueel gehuisvest voor ongeveer vijftien weken en wordt ongeveer 5% gebruikt voor KI. Daarnaast worden alle dieren vierwekelijks gewogen. Dit resulteert in gering of matig ongerief voorafgaande aan experimenten uit deze aanvraag en dus is sprake van hergebruik van dieren.

Ik hoop u hiermee voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,



Bijlage:

- Melding Bijlagen via de post
- NTS AVD104002015357.def_v2.docx

DATUM

10 februari 2016

ONS KENMERK

Aanvraagnummer

AVD104002015357 - Reply

1

PAGINA

3 van 3



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 | [REDACTED] |
| Postcode | [REDACTED] |
| Huisnummer | [REDACTED] |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.
- | | |
|----------------|-----------------|
| Aanvraagnummer | AVD104002015357 |
|----------------|-----------------|

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.
- | | |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | NTS AVD104002015357.def_v2.docx |
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- | | |
|--------------|----------------|
| Naam | [REDACTED] |
| Datum | 10 - 02 - 2016 |
| Handtekening | [REDACTED] |
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen-Universiteit

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
AVD104002015357

Datum 22 FEB 2016
Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 23 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Consequences of divergent selection for natural antibodies in chicken" met aanvraagnummer AVD104002015357. 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. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel.

U kunt met uw project "Consequences of divergent selection for natural antibodies in chicken" starten. De vergunning wordt afgegeven van 22 februari 2016 tot en met 31 december 2020.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC Wageningen University. Dit advies is opgesteld op 2 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. De CCD stelt wel algemene voorwaarden aan dit project.

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

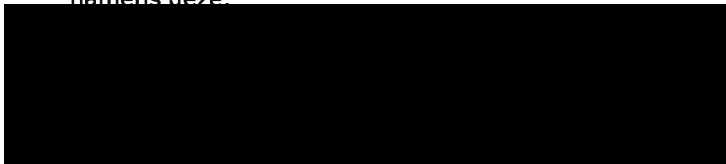
<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

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:

**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: Wageningen-Universiteit
Adres: Postbus 59
Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN
Deelnemersnummer: 10400

deze projectvergunning voor het tijdvak 22 februari 2016 tot en met 31 december 2020, voor het project "Consequences of divergent selection for natural antibodies in chicken" met aanvraagnummer AVD104002015357, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen University. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 23 december 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 11 februari 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 11 februari 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 2 februari 2016, ontvangen op 2 februari 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Bloedafname kippen	Kippen / eigen fok	450	Licht / mild	
Immunisatie kippen	Kippen / eigen fok	220	Licht / mild	
Infectie-experiment kippen	Kippen / eigen fok	2235	Ernstig / severe	
Marge	Kippen / eigen fok	95	Licht / mild	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

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.

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom van beoordeling achteraf voorzien.

Deze beoordeling zal uiterlijk december 2021 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van de dierproeven conform de vergunning waren.

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 blijvende 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.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.

Van: Info-zbo
Verzonden: vrijdag 26 februari 2016 15:13
Aan: 'DEC'
Onderwerp: Terugkoppeling aanvraag AVD104002015357

Geachte DEC,
Enige tijd geleden heeft u de CCD van een advies voorzien betreffende aanvraag AVD104002015357 (Consequences of divergent selection for natural antibodies in chicken). Onze dank voor uw heldere en goed onderbouwde advies.

Wij hebben de aanvrager nog om aanvullende informatie gevraagd. Het ging om de volgende vragen:

- 1) Wij begrijpen dat u in bijlage 1 en 3 zowel hanen als hennen gebruikt, terwijl u in bijlage 2 enkel hennen gebruikt. Kunt u bevestigen dat u in bijlage 1 en 3 beide geslachten gebruikt? En kunt u onderbouwen waarom u in bijlage 2 alleen hennen gebruikt?
- 2) Het aantal te gebruiken dieren in de NTS lijkt niet overeen te komen met het aantal te gebruiken dieren beschreven in de aanvraag.
- 3) Kunt u het totale aantal te gebruiken dieren in bijlage 1 verhelderen? U noemt een aantal van 10-15 dieren per test, maar niet hoeveel testen u zult uitvoeren.
- 4) U geeft aan dat de dieren worden hergebruikt, en in bijlage 3 mogelijk ernstig ongerief ondervinden. Bij vraag C heeft u echter aangegeven dat er geen sprake is van (of een risico van) ernstig ongerief. Kunt u dit consistent maken?

Overige opmerkingen

Het is ons niet volledig helder wat de handelingen zijn geweest met de dieren voordat ze in de onderliggende dierproef worden gebruikt. Mogelijk is hier geen sprake van hergebruik, indien de dieren voor identificatie/karakterisering slechts 1 ingreep nodig is (zie hiervoor het registratieboekje van de NVWA).

De aanvrager heeft deze vragen naar tevredenheid beantwoord en enkele kleine onduidelijkheden nog telefonisch toelicht.

Conform uw advies heeft de CCD dit project vergund, met toevoeging van de volgende voorwaarden:
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.

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom van **beoordeling achteraf** voorzien.

Wij danken u nogmaals voor uw heldere en onderbouwde advies.

Deze e-mail is bedoeld ter informatie, u hoeft niets te doen.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven