

Inventaris Wob-verzoek W16-12S									
nr.	document	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015358								
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 oud				x			x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud				x			x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x			x	
8	Bijlage beschrijving dierproeven 5 oud				x			x	
9	Bijlage beschrijving dierproeven 6				x			x	
10	Bijlage beschrijving dierproeven 7				x			x	
11	Bijlage beschrijving dierproeven 8				x			x	
12	Bijlage beschrijving dierproeven 9				x			x	
13	DEC-advies				x		x	x	
14	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
15	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
16	Begeleidend schrijven reactie				x		x	x	
17	Reactie verzoek aanvulling 1				x		x	x	
18	Reactie verzoek aanvulling 2				x		x	x	
19	Bijlage beschrijving dierproeven 2 herzien				x			x	
20	Bijlage beschrijving dierproeven 3 herzien				x			x	
21	Bijlage beschrijving dierproeven 5 herzien				x			x	
22	Aanvullende reactie DEC				x		x	x	
23	Advies CCD		x						x
24	Beschikking en vergunning				x		x	x	
25	Mail herziening beschikking 2-3-2016				x		x	x	
26	Herziene beschikking				x		x	x	

01 DEC 2015

AVD 32600 2015 176



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? <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 32600 <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 PD ALT / Intravacc Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [Redacted] KvK-nummer
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 Antonie van Leeuwenhoeklaan 9 Postbus 450 Postcode en plaats 3720AL Bilthoven IBAN NL69RBOS0569999014 Tenaamstelling van het rekeningnummer Ministerie van VWS
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	<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 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 0 1 . 0 1 . 2 0 1 6
- Einddatum 0 1 . 0 1 . 2 0 2 1
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Bepalen veiligheid van bulkproducten voor vaccins tot en met het vaccin als eindproduct.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Bepalen veiligheid van grondstoffen voor vaccins tot en met het vaccin als eindproduct.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC ALT
- Postadres Postbus 450, 3720 MA Bilthoven
- E-mailadres

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.
 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
- 9 x bijlage "beschrijving dierproeven"

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 Bilthoven

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.

en andere farmaceutische partijen produceren vaccins voor toepassing in o.a. het Rijksvaccinatie programma (RVP), voor de World Health Organisation (WHO), het Expanded Programme on Immunization (EPI) van UNICEF en andere markten. Vaccins dragen bij aan het voorkomen van infectieziekten en voorkomen ook de verspreiding van deze infectieziekten. De vaccins die produceert en/of vrijgeeft, worden gemaakt van geïnactiveerd virus, en/of levende (verzwakte) bacteriën (vaccin). Het vaccin wordt niet door zelf geproduceerd. Deze vaccins zijn bedoeld om mensen (baby's, jongeren en ouderen) te beschermen tegen de betreffende infectieziekten en in geval van tegen (onderstaand wordt dit nader toegelicht).

Voor de productie van vaccin wordt gebruikt gemaakt van -cellen. Deze -cellen zijn afkomstig van zogeheten Master Cell Banks (MCB) en Working Cell Banks (WCB). De MCB is de oorsprong van de cellen t.b.v. de vaccinproductie. De MCB wordt na opkweken uitgevuld in ampullen en uitvoerig getest. Vervolgens wordt de MCB gebruikt om een nieuwe WCB te produceren. Deze WCB wordt vervolgens ook uitgevuld in ampullen. Vanuit deze WCB wordt de kweek van cellen ingezet ten behoeve van de productie van het Wet- en regelgeving schrijven voor dat de cellen die gebruikt worden voor de productie van biologische producten uitgebreid getest dienen te worden volgens diverse veiligheidsonderzoeken. Ook dienen de cellen goedgekeurd en geregistreerd te zijn bij het College ter Beoordeling van Geneesmiddelen (CBG). Alleen wanneer een WCB is vrijgegeven mag er vaccin mee worden geproduceerd. Vanwege de grote vraag naar gaat de komende jaren de De huidige voorraad WCB zal niet toereikend zijn, om die reden zal er meer WCB gemaakt moet worden. Daarom zijn in dit projectvoorstel veiligheidsonderzoeken opgenomen die dienen om de WCB vrij te geven.

Het -vaccin bestaat uit een bacteriestam Het produceren van een vaccin begint met een verzwakte niet-virulente vorm van deze bacteriestam, De niet-virulente vorm wordt verkregen door de virulente stam vele malen over te enten. Deze bacteriestam kan onderverdeeld worden in een zogenaamde Master Seedlot en een Working Seedlot. Vanuit 1 ampul van de Master Seedlot wordt een Working Seedlot geproduceerd. Wanneer de Working Seedlot van is vrijgegeven, mag vanuit deze Seedlot de productie van het vaccin gestart worden. Vanuit de Working Seedlot kunnen vaccin gemaakt worden. Hoewel dit -vaccin van oudsher een vaccin is, wordt het -vaccin dat bij wordt geproduceerd niet meer als zodanig toegepast. Sinds eind jaren '90 vindt toepassing van dit vaccin plaats bij de behandeling van Door het toepassen van deze wordt er een zeer sterke lokale immunrespons opgewekt welke abnormale cellen vernietigt en zo het risico op een recidief verlaagd.

Voor alle vaccins geldt dat ze moeten voldoen aan alle gestelde wettelijke eisen en zijn vrijgegeven door de autoriteiten, voordat ze gebruikt mogen worden in het RVP, EPI of andere markten. Een van de gestelde eisen is dat zowel de bulkproducten voor deze vaccins als het uiteindelijke eindproduct veilig moeten

zijn.

Aangezien de producten die onder dit project vallen gemaakt zijn van (niet)virulente bacteriën, geïnactiveerde virussen, geïnactiveerde toxines of geproduceerd zijn op █████-cellen, dienen deze grondstoffen van vaccins, de halffabricaten █████ van deze vaccins en de uiteindelijke vaccins d.m.v. een veiligheidsonderzoek in dieren getest te worden. Deze veiligheidsonderzoeken worden voorgeschreven door de Europese Farmacopee (Ph. Eur).

█████ is tevens verplicht om een stabiliteitsprogramma te hanteren. Dit is een programma waarbij gedurende de houdbaarheidsperiode van de vaccins (zo'n 2 à 3 jaar), deze vaccins periodiek gecontroleerd worden op hun veiligheid. Wet- en regelgeving schrijven voor dat de veiligheid █████ van het vaccin tijdens en aan het einde van de houdbaarheidsperiode gecontroleerd moet worden. Dit zijn de zogenaamde stabiliteitsstudies. Dit zijn testen gericht op de bepaling van toxische effecten die specifiek zijn voor het vaccin.

Als laatste kan het soms noodzakelijk zijn om additionele veiligheidstesten uit te voeren. Dit is bijvoorbeeld het geval wanneer een fabrikant een geheel nieuw vaccin produceert, waarbij naast de reguliere veiligheidstesten aanvullende veiligheidstesten wettelijk worden voorgeschreven. Ook in het geval van een geconstateerde afwijking (bijv. foutief glaswerk of één vial met een partikel), waarbij additionele informatie betreffende de veiligheid van een product is gewenst, kunnen er aanvullende veiligheidstesten worden ingezet, zoals in dit project beschreven abnormale toxiciteitstest. Deze abnormale toxiciteitstest richt zich op de bepaling van algemene negatieve bijwerkingen die niet specifiek zijn voor het vaccin.

Voor de WCB van █████-cellen, de █████ Working Seedlot, vaccin halffabricaten en █████, moet er voldaan worden aan de volgende eisen:

- Aan het einde van de dierproef zijn de dieren zwaarder of gelijk aan hun startgewicht (geen gewichtsverlies).
- Gedurende de dierproef vertonen de dieren geen ziekteverschijnselen die gerelateerd zijn aan het te onderzoeken materiaal.
- Gedurende de dierproef mogen er niet meer dieren sterven dan voor het betreffende onderzoek in de EP genoemd (zie betreffende bijlage).

Daarnaast geldt voor de vrijgifte van █████ Seedlot en █████ dat de dieren aan het einde van de dierproef worden aangeboden voor pathologisch onderzoek. Uit dit onderzoek moet blijken dat de dieren vrij zijn van █████ Deze testen staan omschreven in de aangegeven monografieën van de Ph. Eur. 8.0 zoals hieronder weergegeven. Een gedetailleerde toelichting van deze dierproeven vindt men in de bijbehorende bijlage.

Voor █████ houdende vaccins geldt dat deze vrijgegeven worden wanneer er voldaan wordt aan de volgende eisen:

- Na 3 dagen mag het totale gewicht van de testgroep muizen niet lager zijn dan voor inspuiting.
- Na 7 dagen dient de gemiddelde gewichtstoename van de testgroep muizen minstens 60% van de gewichtstoename van de controle dieren te zijn, die op overeenkomstige wijze zijn ingespoten met een fysiologische zoutoplossing.
- Er mogen geen dieren sterven gedurende de gehele dierproef.

De eisen die gesteld worden aan een valide abnormale toxiciteitstest zijn niet toe te schrijven aan een specifiek vaccin. De eisen voor het vrijgeven van een vaccin op abnormale toxiciteit zijn als volgt:

- Aan het einde van de dierproef (test duurt 1 week) zijn de dieren zwaarder of gelijk aan hun startgewicht (geen gewichtsverlies).
- Gedurende de dierproef tonen de dieren geen ziekteverschijnselen.
- Gedurende de dierproef mogen er geen dieren sterven.

Deze testen plus bijbehorende eisen waaraan de vaccins moeten voldoen zijn te vinden in de Ph. Eur. in de volgende monografieën:

█ vaccine 07/2012:0445

- █ for immunotherapy: 01/2005:1929
- Paragraaf 2.6.9. Abnormal Toxicity 01/2008:20609
- Paragraaf 5.2.3 Cell substrates for the production of vaccins for human use (Working Cell Bank)

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 uiteindelijke doel van het project is het bepalen van de veiligheid van bulkproducten voor vaccins tot en met het vaccin als eindproduct conform wet- en regelgeving. De onderzoeksdoelen die onder dit project vallen zijn:

1. Aantonen van de veiligheid van Working Cell Banks van █ voor de productie van vaccins voor humaan gebruik.
2. Aantonen van de veiligheid van Working Seedlot █ voor de productie van █ vaccins.
3. Aantonen van de veiligheid van vaccins voor humaan gebruik.
4. Onderzoek naar de stabiliteit van vaccins ten behoeve van de veiligheid.
5. Aantonen van de veiligheid van vaccins na afwijking in productieproces met minimale impact op het product.

3.3 Belang

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

█ produceert vaccins voor het nationale RVP en omvangrijke internationale immunisatieprogramma's (o.a. EPI). Deze vaccins beschermen baby's, jongeren en ouderen tegen infectieziekten zoals █. Daarnaast produceert █ het █ vaccin, voor de toepassing van █ bij █. De vraag naar dit █ product is de laatste decennia substantieel toegenomen vanwege de toename van █ (sinds 1990 in Nederland een verdubbeling van het aantal geconstateerde █ gevallen). Hiervan zijn er ongeveer 4000 mensen per jaar, welke de zogenaamde █ van █ hebben, en gebaat zijn bij een █ met █. Bij mannen staan tumoren █ de █ plaats van meest voorkomende tumoren (Cijfers: zie Integraal Kankercentrum Nederland, 2014).

Voor alle vaccins geldt dat ze moeten voldoen aan alle gestelde wettelijke eisen ten aanzien van veiligheid en werkzaamheid en zijn vrijgegeven door de autoriteiten, voordat ze gebruikt mogen worden voor bovenstaande doeleinden. D.m.v. dit projectvoorstel kunnen de door █ geproduceerde vaccins of vaccins van derden getest worden op het gebied van veiligheid. Hiermee garandeert █ dat mensen met een veilig vaccin geïmmuniseerd worden.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Van elk geproduceerde Working Cell Bank, Working Seedlot, vaccin halffabricaat of vaccin moet de veiligheid conform wet- en regelgeving bepaald worden.

Hierbij wordt er per veiligheidsonderzoek een groep proefdieren geïnjecteerd met één te testen vaccinconcentratie/hoeveelheid. Deze dieren worden dagelijks geobserveerd op ziekteverschijnselen en wekelijks gewogen (gewicht van proefdieren is een objectieve en meetbare parameter van de algehele gezondheid van proefdieren).

Na 1 tot 6 weken (afhankelijk van het te testen vaccin) worden de dieren geëuthanaseerd en indien nodig aangeboden voor pathologisch onderzoek. Voor een [REDACTED] veiligheidstest (zowel de Working Seedlot als het vaccin als final lot) worden altijd alle dieren aan het einde van de dierproef aangeboden voor pathologisch onderzoek. Voor de andere type vaccins [REDACTED] en de Working Cell Banks van de [REDACTED]-cellen is dit niet nodig, tenzij er iets mis is met deze vaccins waardoor dieren ziek worden of sterven. In overleg worden de dieren wel of niet aangeboden voor pathologisch onderzoek. Op deze manier kan de oorzaak van eventuele ziekte of sterfte worden vastgesteld, en kan worden uitgesloten dat dit te wijten is aan oorzaken gerelateerd aan de grondstoffen of het vaccin zelf. De verkregen data (observatie van algehele gezondheid + weeglijsten) worden beoordeeld conform wet- en regelgeving. Als de algehele gezondheid en de gewichten van de dieren voldoen aan alle kwaliteits- en validiteitscriteria, dan wordt het geteste vaccin vrijgegeven en dus veilig verklaard.

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

Dit projectvoorstel heeft één hoofdlijn:

- 1) Het testen van grondstoffen van vaccins, halffabricaten en/of het uiteindelijke vaccin conform wet- en regelgeving betreffende de veiligheid.

Gebruikte type dierproeven zijn:

- Veiligheidsonderzoek op Working Cell Banks van [REDACTED]-cellen
- Veiligheidsonderzoek op de Working Seedlot van [REDACTED] en het [REDACTED]
- Veiligheidsonderzoek op [REDACTED]
- Veiligheidsonderzoek op [REDACTED]
- Veiligheidsonderzoek op [REDACTED]
- Veiligheidsonderzoek op abnormale toxiciteit (bij nieuw ontwikkeld vaccin of afwijking in het productieproces)

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.

[REDACTED] is een vaccin fabrikant die de markt wil bedienen met veilige en werkzame vaccins. Tevens bedient [REDACTED] externe klanten om hun geproduceerde vaccins vrij te geven, zodat ook zij met deze vaccins de markt op kunnen. Om deze vaccins vrij te geven op veiligheid conform wet- en regelgeving voert [REDACTED] routinematige veiligheidsonderzoeken o.a. door testen uit te voeren met gestandaardiseerde diertesten die beschreven zijn in de Ph. Eur. Wanneer de geteste producten voldoen aan de gestelde eisen, wordt het vaccin vrijgegeven voor humaan gebruik. Bij het niet voldoen aan de veiligheidseisen mag in sommige gevallen de dierproef eenmalig worden herhaald. Wanneer er nogmaals niet aan de eisen wordt voldaan, zal het vaccin worden afgekeurd.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Veiligheidsonderzoek op Working Cell Banks van [REDACTED]-cellen [REDACTED]

2	Veiligheidsonderzoek op Working Cell Banks [REDACTED]
3	Veiligheidsonderzoek op Working Cell Banks [REDACTED]
4	Veiligheidsonderzoek op de Working Seedlot [REDACTED]
5	Veiligheidsonderzoek op [REDACTED]
6	Veiligheidsonderzoek op [REDACTED]
7	Veiligheidsonderzoek op [REDACTED]
8	Veiligheidsonderzoek op abnormale toxiciteit; muizen experiment (bij nieuw ontwikkeld vaccin of afwijking in het productieproces)
9	Veiligheidsonderzoek op abnormale toxiciteit; cavia experiment (bij nieuw ontwikkeld vaccin of afwijking in het productieproces)



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.	32600				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Intravacc				
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>Veiligheidsonderzoek op Working Cell Banks van ██████████</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Veiligheidsonderzoek op Working Cell Banks van ██████████
Volgnummer	Type dierproef					
1	Veiligheidsonderzoek op Working Cell Banks van ██████████					

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 document beschrijft het veiligheidsonderzoek onderzoek op vreemde agentia, conform wet- en regelgeving van de Europese Farmacopee (Ph.Eur) voor de ██████████ Working Cell Bank (WCB) t.b.v. de productie van ██████████. Zie Ph.Eur. paragraaf 5.2.3 Cell substrates for the production of vaccins for human use (Working Cell Bank). Voor elk nieuw geproduceerde WCB dient dit onderzoek uitgevoerd te worden. Het veiligheidsonderzoek zoals beschreven in de Ph. Eur. bestaat uit 3 aparte *in vivo* testen, namelijk een veiligheidstest in volwassen muizen, een veiligheidstest in muizenpups en een onderzoek op aanwezigheid van LCM in volwassen muizen. Deze *in vivo* testen worden in 3 aparte bijlages toegelicht. In deze bijlage wordt de eerste test beschreven waarbij 10 volwassen muizen worden geïnjecteerd met één vaste concentratie ██████████-cellen afkomstig van de

WCB. Gedurende dit experiment, welke 4 weken duurt, worden de dieren op welzijn geobserveerd en in totaal 4 keer gewogen. Als het welzijn van de dieren niet aangetast wordt (de dieren vertonen geen algehele malaise, immobiliteit of gewichtsverlies) dan wordt de WCB veilig bevonden (vrij van vreemde agentia) en kan deze worden vrijgegeven.

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.

Test nr. 1: Veiligheidsonderzoek op de █████ Working Cell Bank in volwassen muizen.

De proef wordt uitgevoerd met in totaal 10 volwassen muizen (9-12 weken). Voordat de test start dienen de dieren individueel gewogen en gemerkt te worden. Op dag 0 worden de dieren intramusculair geïnjecteerd met 10^7 levensvatbare █████-cellen (WCB) in een volume van 0.1 ml. Dit volume kan verdeeld worden over 2 poten. Vervolgens worden de muizen 28 dagen geobserveerd op verschijnselen van algehele malaise en ongerief. Gedurende het onderzoek worden de dieren wekelijks gewogen. Muizen die ziekteverschijnselen vertonen, afnemen in gewicht of zijn doodgegaan, worden pathologisch onderzocht. De dierproef is valide wanneer minimaal 80% van de dieren de test overleefd. De dierproef wordt invalide verklaard wanneer meer dan 20% van de dieren sterven tijdens de proef, mits deze dieren niet ten gevolge van vreemde agentia zijn gestorven. De batch wordt vrij bevonden van vreemde agentia als er geen bewijs is van de aanwezigheid van vreemde agentia (d.w.z. wanneer de dieren gedurende de dierproef (28 dagen) geen ongeriefsverschijnselen vertonen en vanuit pathologisch onderzoek geen bewijs is voor de aanwezigheid van vreemde agentia). De WCB wordt niet vrij gegeven als ongeriefsverschijnselen of pathologisch onderzoek aantonen dat er vreemde agentia aanwezig zijn in de WCB.

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

Per test worden 10 muizen gebruikt, (wettelijk voorgeschreven volgens EP). Een statistische analyse c.q. power analyse is niet mogelijk.

B. De dieren

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

Voor deze dierproef worden muizen gebruikt afkomstig van binnenlands/buitenlands geregistreerde fok. Het betreft muizen met een leeftijdsrange van 9-12 weken bij aanvang van de test. Er is geen voorkeur voor het geslacht van de dieren, zolang de dieren maar van 1 geslacht zijn bij het starten van de test. Voor het testen van één WCB middels deze test zijn 10 volwassen muizen nodig. Voor de komende █████ zijn er █████ WCB producties gepland en komt het totale gebruik op █████ proefdieren voor deze veiligheidstest.

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.

Veiligheidsonderzoek voor WCB middels een *in vivo* experiment wordt voorgeschreven door de Europese Farmacopee §5.2.3 en is opgenomen in het registratiedossier. Voor de test beschreven in deze bijlage is nog geen geaccepteerd alternatief voorhanden. Dieren die duidelijke verschijnselen vertonen van ongerief, dienen voortijdig te worden geëuthanaseerd om onnodig lijden te voorkomen. Vervolgens zullen deze dieren pathologisch worden onderzocht op afwijkingen, zodat de oorzaak achterhaald kan worden. Als het te testen WCB de oorzaak is, zal de WCB niet worden vrijgegeven voor vaccinproductie. Daarnaast zal het veiligheidsonderzoek van de WCB deels sequentieel ingezet worden, waarbij de meest kwetsbare groep, de test met de muizenpups (test nr. 2, zie hiervoor betreffende bijlage) als eerste wordt gestart voor het testen van de WCB. Wanneer deze muizenpups na 1 week nog in leven zijn, zullen de overige onderdelen van het veiligheidsonderzoek (test nr. 1 & 3) gestart worden.

Het intramusculair injecteren + euthanaseren (CO₂ / O₂) van de dieren zijn handelingen die mogelijk fysiek ongerief veroorzaken bij de dieren. Uit historische data blijkt dat vreemde agentia niet voorkomen in de door [REDACTED]. De kans dat de dieren ongerief zullen ondervinden als gevolg van vreemde agentia is hierdoor minimaal. Het injecteren en euthanaseren wordt door getraind en bekwaam personeel uitgevoerd. Ook dit verlaagt het ongerief en verhoogt de verfijning van deze dierproef.

Deze test wordt regulier uitgevoerd om de veiligheid te bepalen van de WCB die gebruikt wordt voor de productie van vaccins. Een vermindering van het aantal dieren per te testen WCB is niet mogelijk. Wet- en regelgeving schrijven voor, dat voor dit onderdeel (test nr. 1) er minimaal 10 dieren gebruikt worden om te bepalen of de WCB vrij is van vreemde agentia.

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.

Het injecteren en euthanaseren wordt door getraind en bekwaam personeel uitgevoerd. Dit verlaagt het ongerief en verhoogt de verfijning van deze dierproef.

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.

Wettelijk is het verplicht om van elke nieuw geproduceerde WCB de veiligheid te bepalen middels een dierproef. De WCB wordt niet vrij gegeven als ongeriefsverschijnselen of pathologisch onderzoek aantonen dat er vreemde agentia aanwezig zijn in de WCB. In principe worden er geen herhalingen uitgevoerd.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

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 > Anesthesie en analgesie worden niet toegepast bij een intramusculaire injectie, het ongerief is voor deze handeling is laag.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting verwacht.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Indien er vreemde agentia in het vaccin aanwezig zijn kunnen de dieren als gevolg hiervan ziek worden (en dus ongerief ondervinden). Dit is echter niet waarschijnlijk op basis van historische data.

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

N.v.t.

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.

Voor test nr. 1 (test in volwassen muizen) is er sprake van licht 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.

Na injectie met de WCB ██████████ zijn de dieren niet meer geschikt voor andere doeleinden, aangezien de muizen geïnjecteerd zijn met biologische agentia. Dit kan invloed hebben op de resultaten wanneer deze dieren voor een andere dierproef gebruikt worden. Aan het einde van de dierproef worden om deze reden alle dieren geëuthanaseerd.

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.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 het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="2"/> | <input type="text" value="Veiligheidsonderzoek op Working Cell Banks van █████-cellen (zuigeling muizen)"/> |

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 document beschrijft het veiligheidsonderzoek op vreemde agentia, conform wet- en regelgeving van de Europese Farmacopee (Ph.Eur) voor de █████ Working Cell Bank (WCB) t.b.v. de productie van █████. Zie Ph.Eur. paragraaf 5.2.3 Cell substrates for the production of vaccins for human use (Working Cell Bank). Voor elk nieuw geproduceerde WCB dient dit onderzoek uitgevoerd te worden. Het veiligheidsonderzoek zoals beschreven in de Ph. Eur. bestaat uit 3 aparte *in vivo* testen, namelijk een veiligheidstest in volwassen muizen, een veiligheidstest in muizenpups en een onderzoek op aanwezigheid van LCM in volwassen muizen. Deze *in vivo* testen worden in 3 aparte bijlages toegelicht. In deze bijlage wordt de tweede test beschreven waarbij 10 muizenpups worden geïnjecteerd met één vaste concentratie █████-cellen afkomstig van de WCB.

Gedurende dit experiment, welke 4 weken duurt, worden de dieren op welzijn geobserveerd en in totaal 4 keer gewogen. Als het welzijn van de dieren niet aangetast wordt (de dieren vertonen geen algehele malaise, immobiliteit of gewichtsverlies) dan wordt de WCB veilig bevonden (vrij van vreemde agentia) en kan deze worden vrijgegeven.

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.

Test nr. 2: Veiligheidsonderzoek op de █████ Working Cell Bank in muizenpups.

De proef wordt uitgevoerd met 2 nesten muizenpups, deze muizenpups moeten jonger dan 24 uur zijn. In totaal zijn er 10 muizenpups nodig. Voor het verkrijgen van deze 2 nesten pups worden 2 drachtige moeders gebruikt. De moederdieren maken geen deel uit van de proef en ondergaan geen biotechnische handelingen. De moederdieren zijn nog steeds "proefdieren", maar ze worden niet meegerekend in de "dierproef". De muizenpups worden op dag 0 subcutaan ingespoten met 10^7 levensvatbare █████ cellen (WCB) in een volume van 0,1 ml. Vervolgens worden de dieren 28 dagen geobserveerd op verschijnselen van algehele malaise en ongerief. Gedurende het onderzoek worden de gehele nesten wekelijks gewogen. Muizen die ziekteverschijnselen vertonen, afnemen in gewicht of zijn doodgegaan, worden pathologisch onderzocht. De dierproef is valide wanneer minimaal 80% van de dieren de test overleefd. De dierproef wordt invalide verklaard wanneer meer dan 20% van de dieren sterven tijdens de proef, mits deze dieren niet ten gevolge van vreemde agentia zijn gestorven. De WCB wordt vrij bevonden van vreemde agentia als er geen bewijs is van de aanwezigheid van vreemde agentia (d.w.z. wanneer de dieren gedurende de dierproef (28 dagen) geen ongeriefsverschijnselen vertonen en vanuit pathologisch onderzoek geen bewijs is voor de aanwezigheid van vreemde agentia). De WCB wordt niet vrij gegeven als ongeriefsverschijnselen of pathologisch onderzoek aantonen dat er vreemde agentia aanwezig zijn in de WCB.

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

Per test worden 10 muizenpups gebruikt (wettelijk voorgeschreven volgens EP). Een statistische analyse c.q. power analyse is niet mogelijk.

B. De dieren

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

Voor deze dierproef worden muizen gebruikt afkomstig van binnenlands /buitenlands geregistreerde fok. Voor dit veiligheidsonderzoek in muizenpups zijn 2 drachtige moeders nodig voor het verkrijgen van 10 muizenpups (2 nesten). Er is geen voorkeur voor het geslacht. Voor het testen van één WCB zijn 10 muizenpups nodig. Voor de komende █████ zijn er █████ WCB producties gepland en komt het totale gebruik op █████ proefdieren voor deze veiligheidstest. De moederdieren worden niet mee genomen in deze berekening. Deze dieren maken geen deel uit van het experiment, aangezien er geen handelingen op deze moederdieren worden uitgevoerd. Wel zijn zij een essentieel voor deze dierproef. Zij verzorgen de pups gedurende de vier weken dat dit experiment duurt. Zonder de moederdieren zullen de pups vroegtijdig sterven.

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.

Veiligheidsonderzoek voor WCB middels een *in vivo* experiment wordt voorgeschreven door de Europese Farmacopee §5.2.3 en is opgenomen in het registratiedossier. Voor test nr. 2 (muizenpups) is nog geen geaccepteerd alternatief voorhanden. Dieren die duidelijke verschijnselen vertonen van ongerief, dienen voortijdig te worden geëuthanaseerd om onnodig lijden te voorkomen. Vervolgens zullen deze dieren pathologisch worden onderzocht op afwijkingen, zodat de oorzaak achterhaald kan worden. Als het te testen WCB de oorzaak is dan zal de WCB niet worden vrijgegeven voor vaccin productie.

Als verfijning voor het ongerief van de moederdieren worden alleen de pups weggehaald die worden ingespoten met de █████-cellen. De overige pups blijven bij de moeder tot de ingespoten pups zijn teruggeplaatst. Bij een groepsgrootte van 5 dieren of minder, blijft er minimaal 1 pup bij de moeder liggen. Deze wordt ingespoten nadat de reeds ingespoten pups bij de moeder zijn terug geplaatst. Dit minimaliseert het ongerief dat het moederdier ondervindt. De eventueel overtollige pups zullen daarna geen deel meer uitmaken van het experiment en geëuthanaseerd worden. Daarnaast zal het veiligheidsonderzoek van de WCB deels sequentieel ingezet worden, waarbij de meest kwetsbare groep, de test met de muizenpups (deze bijlage), als eerste wordt gestart voor het testen van de WCB. Wanneer deze muizenpups na 1 week nog in leven zijn, zullen de overige onderdelen van het veiligheidsonderzoek (test nr. 1 & 3, zie hiervoor betreffende bijlage) gestart worden.

Het subcutaan injecteren + euthanaseren (CO₂ / O₂) van de dieren zijn handelingen die mogelijk fysiek ongerief veroorzaken bij de dieren. Uit historische data blijkt dat vreemde agentia niet voorkomen in de door █████ geproduceerde WCB's. De kans dat de dieren ongerief zullen ondervinden als gevolg van vreemde agentia is hierdoor minimaal. Het injecteren en euthanaseren wordt door getraind en bekwaam personeel uitgevoerd. Ook dit verlaagt het ongerief en verhoogt de verfijning van deze dierproef.

Deze test wordt regulier uitgevoerd om de veiligheid te bepalen van WCB die gebruikt worden voor de productie van vaccins. Een vermindering van het aantal dieren per te testen WCB is niet mogelijk. Wet- en regelgeving schrijven voor, dat voor dit onderdeel (test nr. 2) er minimaal 10 dieren gebruikt worden om te bepalen of de WCB vrij is van vreemde agentia..

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.

Het injecteren en euthanaseren wordt door getraind en bekwaam personeel uitgevoerd. Dit verlaagt het ongerief en verhoogt de verfijning van deze dierproef. Tevens wordt narcose toegepast bij i.c. injectie om het ongerief te verlagen.

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.

Wettelijk is het verplicht om van elke nieuw geproduceerde WCB de veiligheid te bepalen middels een dierproef. De WCB wordt niet vrij gegeven als ongeriefsverschijnselen of pathologisch onderzoek aantonen dat er vreemde agentia aanwezig zijn in de WCB. In principe worden er geen herhalingen uitgevoerd.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

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 > Anesthesie en analgesie worden niet toegepast bij een subcutane injectie, het ongerief is voor deze handeling is laag.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting verwacht.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Indien er vreemde agentia in het vaccin aanwezig zijn kunnen de dieren als gevolg hiervan ziek worden (en dus ongerief ondervinden). Dit is echter niet waarschijnlijk op basis van historische data.

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

Nvt

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.

Voor test nr. 2 (test in muizenpups) is er sprake van licht 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.

Na injectie met de WCB ██████████ zijn de dieren niet meer geschikt voor andere doeleinden, aangezien de muizen geïnjecteerd zijn met biologische agentia. Dit kan invloed hebben op de resultaten wanneer deze dieren voor een andere dierproef gebruikt worden. Aan het einde van de dierproef worden alle dieren om deze reden geëuthanaseerd.

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.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	32600				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Intravacc				
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>3</td><td>Veiligheidsonderzoek op Working Cell Banks van █████-cellen (Onderzoek naar LCM)</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	3	Veiligheidsonderzoek op Working Cell Banks van █████-cellen (Onderzoek naar LCM)
Volgnummer	Type dierproef					
3	Veiligheidsonderzoek op Working Cell Banks van █████-cellen (Onderzoek naar LCM)					

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 document beschrijft het veiligheidsonderzoek onderzoek op vreemde agentia, conform wet- en regelgeving van de Europese Farmacopee (Ph.Eur) voor de █████ Working Cell Bank (WCB) t.b.v. de productie van █████ vaccins. Zie Ph.Eur. paragraaf 5.2.3 Cell substrates for the production of vaccins for human use (Working Cell Bank). Voor elk nieuw geproduceerde WCB dient dit onderzoek uitgevoerd te worden. Het veiligheidsonderzoek zoals beschreven in de Ph. Eur. bestaat uit 3 aparte *in vivo* testen; namelijk een veiligheidstest in volwassen muizen, een veiligheidstest in muizenpups en een onderzoek op aanwezigheid van LCM in volwassen muizen. Deze *in vivo* testen worden in 3 aparte bijlages toegelicht.

In deze bijlage wordt test nr. 3 beschreven waarbij 10 volwassen muizen worden geïnjecteerd met één vaste concentratie █████-cellen afkomstig van de WCB.

In deze test wordt specifiek getest op de aanwezigheid van lymfocytische choriomeningitis (LCM)veroorzakende virussen. Gedurende dit experiment, welke 4 weken duurt, worden de dieren op welzijn geobserveerd en in totaal 4 keer gewogen. Als het welzijn van de dieren niet aangetast wordt (de dieren vertonen geen algehele malaise, immobiliteit of gewichtsverlies) dan wordt de WCB veilig bevonden (vrij van LCM veroorzakende virussen) en kan deze worden vrijgegeven.

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.

Test nr. 3: Veiligheidsonderzoek voor de Working Cell Bank op afwezigheid LCM in volwassen muizen.
De proef wordt uitgevoerd met in totaal 10 volwassen muizen (9-12 weken). Voordat de test start dienen de dieren individueel gewogen en gemerkt te worden. Op dag 0 worden de dieren intracerebraal ingespoten worden met [REDACTED] (WCB) in een volume van 10 µl, waarna ze 28 dagen lang geobserveerd worden op verschijnselen van algehele malaise en ongerief. Gedurende het onderzoek worden de dieren wekelijks gewogen. Wanneer de dieren na 28 dagen geen ongeriefsverschijnselen vertonen kan worden aangenomen dat de geteste WCB vrij is van LCM. Muizen die ziekteverschijnselen vertonen, afnemen in gewicht of zijn doodgegaan, worden pathologisch onderzocht. De dierproef wordt valide verklaard wanneer meer dan 80% van de dieren de proef overleefd. De dierproef wordt invalide verklaard wanneer meer dan 20% van de dieren sterven tijdens de proef, mits deze dieren niet ten gevolge van LCM zijn gestorven. De WCB wordt vrij bevonden van LCM als er geen bewijs is van de aanwezigheid van LCM (d.w.z. wanneer de dieren in de 28 dagen geen ongeriefsverschijnselen vertonen en vanuit pathologisch onderzoek geen bewijs is LCM). De WCB wordt niet vrij gegeven als ongeriefsverschijnselen of pathologisch onderzoek aantonen dat er LCM aanwezig is WCB.

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

Per test worden 10 dieren gebruikt, (wettelijk voorgeschreven volgens EP). Een statistische analyse c.q. power analyse is niet mogelijk.

B. De dieren

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

Voor deze dierproef worden muizen gebruikt afkomstig van binnenlands /buitenlands geregistreerde fok. Het betreft voor deze test muizen met een leeftijdsrange van 9-12 weken bij aanvang van de test. Er is voor deze test geen voorkeur voor het geslacht van de dieren zolang de dieren maar van 1 geslacht zijn bij het starten van de test. Voor het testen van één WCB zijn 10 dieren nodig. Voor de komende [REDACTED] [REDACTED] zijn er [REDACTED] WCB producties gepland en komt het totale gebruik op [REDACTED] proefdieren voor deze veiligheidstest. De moederdieren worden niet mee genomen in deze berekening. Deze dieren maken geen deel uit van het experiment, aangezien er geen handelingen met deze moederdieren worden uitgevoerd. Wel zijn zij onderdeel van deze dierproef.

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.

Veiligheidsonderzoek voor WCB middels een *in vivo* experiment wordt voorgeschreven door de Europese Farmacopee §5.2.3 en is opgenomen in het registratiedossier.

Voor test nr. 3 (onderzoek op LCM) is nog geen geaccepteerd alternatief voorhanden. Daar waar het gaat om het testen op specifieke virussen is het overstappen naar *in vitro* testen (bijv. PCR) een mogelijkheid, mits er een gevalideerde methode voorhanden is met geschikte gevoeligheid en gegarandeerde specificiteit, welke erkend wordt door registratieautoriteiten. Echter omdat een LCM test m.b.v. PCR afwijkt van de Ph.Eur zal validatieonderzoek nodig zijn. ■■■ voert deze test sporadisch uit, maximaal ■■■ maal per ■■■. Het opzetten van een gedegen validatieonderzoek voor het ontwikkelen van een *in vitro* alternatief, zoals bovengenoemde PCR, zonder dat hiermee extra dierproeven nodig zijn is onmogelijk. Wel zal ■■■ in gesprek blijven met overige betrokken onderzoeksinstanties en het EDQM om op de hoogte te blijven omtrent de ontwikkelingen van alternatieven voor het aantonen van vreemde virussen in cell banks. Daarnaast is gewenst dat een dergelijk alternatief gevalideerd wordt op Europees niveau. ■■■ zal zich hiervoor wel open stellen en deelnemen aan bijvoorbeeld de hiervoor benodigde ringstudies. Op het gebied van verfijning worden de volgende maatregelen toegepast: Voor de huisvesting wordt er kooiverrijking toegepast gedurende de hele dierproef (4 weken). Daarnaast zal het veiligheidsonderzoek van de WCB deels sequentieel ingezet worden, waarbij de meest kwetsbare groep, de test met de muizenpups (test nr. 2), als eerste wordt gestart voor het testen van de WCB. Wanneer deze muizenpups na 1 week nog in leven zijn, zullen de overige onderdelen van het veiligheidsonderzoek (test nr. 1 & 3) gestart worden.

Het intracerebraal injecteren + euthanaseren (CO₂ / O₂) van de dieren zijn handelingen die mogelijk fysiek ongerief veroorzaken bij de dieren. Uit historische data blijkt dat vreemde agentia niet voor te komen in de ■■■ geproduceerde WCB's. De kans dat de dieren ongerief zullen ondervinden als gevolg van vreemde agentia is hierdoor minimaal. Het injecteren en euthanaseren wordt door getraind en bekwaam personeel uitgevoerd. Ook dit verlaagt het ongerief en verhoogt de verfijning van deze dierproef. Daarnaast wordt er narcose wordt toegepast bij de intracerebrale injectie (om het ongerief te verlagen).

Deze test wordt regulier uitgevoerd om de veiligheid te bepalen van WCB die gebruikt worden voor de productie van vaccins. Een vermindering van het aantal dieren per te testen WCB is niet mogelijk. Wet- en regelgeving schrijven voor, dat voor dit onderdeel (test nr. 3) er minimaal 10 dieren gebruikt worden om te bepalen of de WCB vrij is van LCM. Een vermindering van dit aantal dieren zal leiden tot invalide testen en dus herhaling van de diertest.

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.

Het injecteren en euthanaseren wordt door getraind en bekwaam personeel uitgevoerd. Dit verlaagt het ongerief en verhoogt de verfijning van deze dierproef. Tevens wordt narcose toegepast bij i.c. injectie om het ongerief te verlagen.

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.

Wettelijk is het verplicht om van elke nieuw geproduceerde WCB de veiligheid te bepalen middels een dierproef. De WCB wordt niet vrij gegeven als ongeriefsverschijnselen of pathologisch onderzoek aantonen dat er vreemde agentia aanwezig zijn in de WCB. In principe worden er geen herhalingen uitgevoerd.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

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.c. toediening onder narcose i.v.m. optreden pijn.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting verwacht.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Indien er vreemde agentia in het vaccin aanwezig zijn kunnen de dieren als gevolg hiervan ziek worden (en dus ongerief ondervinden). Dit is echter niet waarschijnlijk op basis van historische data.

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

Nvt

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.

Voor test nr. 3 (test in volwassen muizen, onderzoek naar LCM) is er sprake van licht 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.

Na injectie met de WCB ██████████ zijn de dieren niet meer geschikt voor andere doeleinden, aangezien de muizen geïnjecteerd zijn met biologische agentia. Dit kan invloed hebben op de resultaten wanneer deze dieren voor een andere dierproef gebruikt worden. Aan het einde van de dierproef worden alle dieren om deze reden geëuthanaseerd.

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.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	32600				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Intravacc				
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>4</td><td>Veiligheidsonderzoek op de Working Seedlot van [REDACTED]</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	4	Veiligheidsonderzoek op de Working Seedlot van [REDACTED]
Volgnummer	Type dierproef					
4	Veiligheidsonderzoek op de Working Seedlot van [REDACTED]					

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 document beschrijft het veiligheidsonderzoek conform wet & regelgeving op de working Seedlot van [REDACTED] het [REDACTED] als Final Lot van de Europese Farmacopee (Ph.Eur.), zie Ph.Eur. [REDACTED]. In dit onderzoek wordt vastgesteld of de Working Seedlot en het vaccin van [REDACTED] vrij zijn van de virulente vorm van [REDACTED]. Het gaat hierbij om een vergelijkbare test voor twee verschillende producten.

In de test voor de working seedlot worden dieren geïnjecteerd met 1 ml van de Working Seedlot dat ten [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] bevat. Tijdens dit experiment worden de dieren op welzijn geobserveerd (de dieren vertonen geen algehele malais, immobiliteit of gewichtsverlies) en worden wekelijks

gewogen gedurende 6 weken. Aan het einde van dit experiment worden de dieren aangeboden voor pathologisch onderzoek. De [REDACTED] seedlot wordt vrijgegeven als de dieren niet ziek worden of sterven (voor een valide test mag er max. 1 dier sterven aan een oorzaak anders dan een infectie [REDACTED], geen gewicht verliezen en dat pathologisch onderzoek uitwijst dat er geen aanwijzingen zijn voor de aanwezigheid van [REDACTED]. De verkregen resultaten uit het pathologisch onderzoek worden als meest waardevol beschouwd.

In de test voor de Final Lot van het [REDACTED] vaccin worden dieren geïnjecteerd met [REDACTED] dosis van het te testen vaccin.). Gedurende dit experiment worden de dieren op welzijn geobserveerd en worden ze wekelijks gewogen gedurende 6 weken. Aan het einde van deze diertest worden de dieren aangeboden voor pathologisch onderzoek. Het [REDACTED] vaccin wordt vrijgegeven, als het welzijn van de dieren gedurende de hele diertest niet wordt aangetast (dieren sterven niet en worden niet ziek), er geen gewichtsverlies wordt geconstateerd en als pathologisch onderzoek uitwijst, dat er geen aanwijzingen zijn voor de aanwezigheid van [REDACTED]. De verkregen resultaten uit het pathologisch onderzoek worden als meest waardevol beschouwd.

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 test voor de [REDACTED] seedlot bestaat uit één groep van 10 vrouwelijke cavia's. Op de dag van aankomst worden de dieren gewogen en gemerkt (door middel van kleuring). Daarna krijgen de dieren minimaal 1 week tijd om te acclimatiseren. Het gewicht van de cavia's bij aanvang van de test ligt tussen de 250-400 gram. Op dag 0 worden de dieren individueel gewogen en subcutaan geïmmuniseerd met [REDACTED] van de te testen Working Seedlot. Gedurende 6 weken worden alle dieren geobserveerd op verschijnselen van algehele malaise en ongerief. Tevens worden de dieren wekelijks gewogen (gewichtstoe- of afname is een meetbare parameter van het welzijn van de dieren). Aan het einde van de diertest worden de dieren geëuthanaseerd (KR gevolgd door Pentobarbital). Als de dieren gedurende de hele proef geen ziekteverschijnselen vertonen, er geen gewichtsverlies geconstateerd wordt, er niet meer dan 1 dier sterft en pathologisch onderzoek uitwijst dat er geen aanwijzingen zijn voor de aanwezigheid van [REDACTED] voldoet de Working Seedlot aan de veiligheidseisen en kan het worden vrijgegeven voor productie van het [REDACTED].

De test voor de final lot van een [REDACTED] vaccin bestaat uit één groep van 6 vrouwelijke cavia's. Op de dag van aankomst worden de dieren gewogen en gemerkt (door middel van kleuring). Daarna krijgen de dieren minimaal 1 week de tijd om te acclimatiseren. Het gewicht bij aanvang van de cavia's ligt bij aanvang van de test tussen de 250-400 gram. Op dag 0 worden de dieren individueel subcutaan geïmmuniseerd met [REDACTED] dosis van het te testen vaccin in 1 ml. Gedurende 6 weken worden alle dieren geobserveerd op verschijnselen van algehele malaise en ongerief. Tevens worden de dieren wekelijks gewogen (gewichtstoe- of afname is een meetbare parameter van het welzijn van de dieren). Aan het einde van de diertest worden de dieren geëuthanaseerd (KR gevolgd door Pentobarbital). Als de dieren gedurende de hele proef geen ziekteverschijnselen vertonen, er geen gewichtsverlies geconstateerd wordt, er geen dieren sterven aan de gevolgen van een infectie door [REDACTED] en pathologisch onderzoek uitwijst dat er geen aanwijzingen zijn voor de aanwezigheid van virulente [REDACTED] voldoet het vaccin aan de veiligheidseisen en kan het worden vrijgegeven.

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

Voor beide testen wordt het aantal dieren (10 dieren voor de Working Seedlot en 6 dieren voor testen op de final lot) wettelijk voorgeschreven (Ph.Eur). Een statistische analyse c.q. power analyse is niet mogelijk.

B. De dieren

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

Voor deze dierproef worden cavia's gebruikt afkomstig van binnenlands /buitenlands geregistreerde fok. Het betreft vrouwelijke cavia's die tussen de 250-400 gram wegen bij aanvang van de test. Gezien de duur van deze test en voorkeur voor gezamenlijke huisvesting van de cavia's (cavia's zijn sociale dieren) worden vrouwelijke dieren gebruikt voor dit experiment. Deze dieren zullen niet gaan vechten om de sociale rangorde te bepalen wanneer ze een langere periode (in dit geval 6 weken) samen zijn.

Voor het testen van de [redacted] Working Seedlot zijn per test 10 dieren nodig [redacted] Seedlot per test). Voor de periode van [redacted] worden [redacted] testen verwacht. Dit brengt het totale proefdiergebruik op 50 dieren.

Voor het testen van het [redacted] vaccin zijn er per test 6 dieren nodig [redacted]. Voor de periode van [redacted] worden er [redacted] testen verwacht [redacted] testen per jaar). Dit brengt het totale proefdiergebruik op [redacted] 1620 dieren voor [redacted]

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.

Veiligheidsonderzoek op de [redacted] Working Seedlot en [redacted] vaccins ([redacted] middels een *in vivo* experiment wordt voorgeschreven door de Ph.Eur.paragraaf [redacted]. Er is nog geen geaccepteerd alternatief voorhanden, waarmee mogelijke relevante veranderingen betreffende de virulentie in kaart kunnen worden gebracht. Er zijn wel onderzoeken gaande welke interessant zijn met het oog op het ontwikkelen van alternatieven, zie o.a. PLoS One. 2015 Jul

[redacted] stam welke voor de productie van het [redacted] vaccin wordt gebruikt is heeft echter vele varianten, in de vorm van aanwezige mutaties binnen het genoom. Hierbij is moeilijk in te schatten welke mutaties er allemaal betrokken zijn bij het inactiveren van de virulente vorm van deze bacterie. Het ontwikkelen van een alternatief voor deze dierproef zal daarom nog een lange weg te gaan hebben. Wij schatten op meer dan 10 jaar onderzoek.

■■■■ zal zich wel op de hoogte blijven houden op de ontwikkelingen binnen dit virulentieonderzoek van ■■■■ en indien mogelijk bijdragen aan het ontwikkelen van een alternatief.

De testen worden conform regel- en wetgeving uitgevoerd. D.m.v. deze testen kan de ■■■■ Working Seedlot worden vrijgegeven voor de productie van ■■■■ vaccins en kan het ■■■■ vaccin ■■■■ vrijgegeven worden voor gebruik in patiënten. Een vermindering van het aantal dieren per te testen Working Seedlot en ■■■■ vaccin is niet mogelijk. Wet- en regelgeving schrijven voor dat er per test resp. minimaal 10 en 6 dieren gebruikt moeten worden. Voor de huisvesting is kooiverrijking toegepast gedurende de hele dierproef.

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.

Het subcutaan injecteren en het euthanaseren van de dieren kan fysiek ongerief veroorzaken bij de dieren. Het injecteren en euthanaseren wordt door getraind en bekwaam personeel uitgevoerd, wat het ongerief voor de dieren beperkt.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Het is wettelijk verplicht om van elk nieuw ■■■■ Working Seedlot en van elke final lot van een ■■■■ vaccin de veiligheid te bepalen middels een dierexperiment. Experimenten met dezelfde Working Seedlot of final lot van een vaccin mogen, indien de test de eerste keer een invalide wordt verklaard (er sterven meer dan 2 dieren aan gevolgen die niet te herleiden zijn naar virulente ■■■■) mag deze test eenmalig worden herhaald. Wanneer tijdens deze herhaling niet meer dan 1 dier overlijdt binnen de observatieperiode van 6 weken en er tijdens de autopsie wederom geen tekenen van virulente ■■■■ wordt geobserveerd, wordt het vaccin en de test alsnog valide verklaard. Een goedgekeurde en vrijgegeven Working Seedlot of final lot van een vaccin hoeft niet opnieuw getest te worden.

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?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting verwacht.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

n.v.t.

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

n.v.t.

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 ongeriefsclassificatie voor beide dierproeven is matig'. Het subcutaan injecteren met [REDACTED] kan matig ongerief bij de dieren veroorzaken. De euthanasie methode wordt uitgevoerd onder anesthesie (Ketamine + Xylazine gevolgt door Pentobarbital). Dit veroorzaakt licht ongerief. Er bestaat een kleine kans dat er virulente [REDACTED] aanwezig zijn in de [REDACTED] Working seedlot evenals in het [REDACTED]. Als dit het geval is zullen de dieren ziek worden en valt de ongeriefsclassificatie hoger uit. Het is zeer onwaarschijnlijk dat dit gebeurt, dit is namelijk nog niet eerder voorgekomen in voorgaande testen.

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 worden na afloop geëuthanaseerd en aangeboden voor pathologisch onderzoek om uitsluitel te geven voor de aanwezigheid van virulente mycobacteriën. De dieren zijn hierna niet meer bruikbaar voor onderzoek.

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.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	32600				
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Intravacc				
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>5</td><td>Veiligheidsonderzoek op [redacted] en [redacted] vaccin [redacted]</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	5	Veiligheidsonderzoek op [redacted] en [redacted] vaccin [redacted]
Volgnummer	Type dierproef				
5	Veiligheidsonderzoek op [redacted] en [redacted] vaccin [redacted]				

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 document beschrijft de veiligheidsonderzoeken van het [redacted] en het [redacted] vaccin conform wet- en regelgeving van de Europese Farmacopee (Ph.Eur), zie Ph.Eur. [redacted] (Dit document beschrijft [redacted] veiligheidstesten betreffende het [redacted] vaccin). [redacted] produceert zowel [redacted] als halffabricaat (tussen product) en het [redacted] vaccin (eind product). Tevens heeft [redacted] klanten die het [redacted] als product afnemen bijv. voor het formuleren van veterinaire vaccins. Om deze reden moeten beide producten gecontroleerd en vrijgegeven worden betreffende hun veiligheid (afwezigheid van [redacted]).

Test 1 en 2 betreffen testen die worden uitgevoerd op het [REDACTED] test 3 betreft een test welke uitgevoerd wordt op het [REDACTED] vaccin als eindproduct. Hiervoor worden 3 verschillende dierexperimenten gebruikt.

Test 1: Veiligheidsbepaling van het [REDACTED]

In deze test wordt onderzocht of het onschadelijke [REDACTED] geheel [REDACTED] en dus vrij is van het [REDACTED]. In deze test worden dieren geïnjecteerd met [REDACTED] van één vaste concentratie van het te testen [REDACTED]. Gedurende 3 weken worden alle dieren geobserveerd op welzijn. Tevens worden de dieren wekelijks gewogen (gewichtstoe- of afname is een meetbare parameter van het welzijn van de dieren). Aan het einde van de dierproef worden de dieren geëuthanaseerd. Als de dieren gedurende de hele proef geen [REDACTED] ziekteverschijnselen vertonen, er geen gewichtsverlies geconstateerd wordt en er geen dieren sterven voldoet het [REDACTED] aan de veiligheidseisen en kan het worden vrijgegeven voor het formuleren van het [REDACTED] vaccin, zowel voor humaan als veterinaire gebruik.

Test 2: Veiligheidsbepaling [REDACTED]

In deze test wordt onderzocht of het [REDACTED]

[REDACTED] voor een periode van 6 weken. Na deze zes weken worden 2 groepen dieren (controle en test groep) geïnjecteerd met [REDACTED] ml van het te testen [REDACTED]. Gedurende dit experiment worden de dieren op welzijn geobserveerd en worden ze wekelijks gewogen (gewichtstoe- of afname is een meetbare parameter van het welzijn van de dieren). Aan het einde van de dierproef worden de dieren geëuthanaseerd. Als de dieren gedurende de hele proef geen [REDACTED] ziekteverschijnselen vertonen, er geen gewichtsverlies geconstateerd wordt en er geen dieren sterven voldoet het [REDACTED] aan de veiligheidseisen en kan het worden vrijgegeven voor het formuleren van het [REDACTED] vaccin, zowel voor humaan als veterinaire gebruik.

Test 3: Veiligheidsbepaling van [REDACTED]

In deze test wordt onderzocht of het [REDACTED] vaccin [REDACTED] vrij is van het [REDACTED]. Het [REDACTED] vaccin is geformuleerd [REDACTED]

De matrix van het [REDACTED] vaccin is compleet anders dan dat van het [REDACTED]

[REDACTED] Deze veranderingen kunnen van invloed zijn op de veiligheid van het [REDACTED] vaccin.

De dieren worden geïnjecteerd met 1 concentratie van het te testen [REDACTED] vaccin [REDACTED]. Gedurende dit experiment worden de dieren op welzijn geobserveerd en worden ze wekelijks gewogen (gewichtstoe- of afname is een meetbare parameter van het welzijn van de dieren). Als de dieren gedurende de hele proef geen [REDACTED] ziekteverschijnselen vertonen, er geen gewichtsverlies geconstateerd wordt en er geen dieren sterven voldoet het [REDACTED] vaccin aan de veiligheidseisen en kan het worden vrijgegeven voor humaan gebruik.

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.

Test 1: Veiligheidsbepaling van het [REDACTED]

Op de dag van aankomst worden de dieren gewogen en gemerkt (d.m.v. kleuring). Daarna krijgen de dieren minimaal 1 week te tijd om te acclimatiseren. De test bestaat uit één groep van 5 vrouwelijke cavia's. Het startgewicht van de cavia's ligt tussen de 250-350 gram. Op dag 0 (start van experiment) worden de dieren individueel subcutaan geïnjecteerd met [REDACTED] van het te testen [REDACTED]. Gedurende

3 weken worden alle dieren geobserveerd op verschijnselen van algehele malaise en ongerief. Tevens worden de dieren wekelijks gewogen. Aan het einde van de dierproef worden de dieren geëuthanaseerd (KR gevolgd door Pentobarbital). Als de dieren gedurende de hele proef geen [REDACTED] ziekteverschijnselen vertonen, er geen gewichtsverlies geconstateerd wordt en er geen dieren sterven voldoet het [REDACTED] aan de veiligheidseisen en kan het worden vrijgegeven voor het [REDACTED] vaccin, zowel voor humaan als veterinair gebruik.

Test 2: Veiligheidsbepaling [REDACTED]

In deze test wordt het [REDACTED] 2 samples (controle sample en test sample) met elk hun eigen voorbehandeling. De *in vivo* test bestaat uit twee groepen van elk 5 vrouwelijke cavia's. Op de dag van aankomst worden de dieren gewogen en gemerkt (d.m.v. kleuring). Daarna krijgen de dieren minimaal 1 week te tijd om te acclimatiseren. Het start gewicht van de cavia's ligt tussen de 250-350 gram. Op dag 0 van de diertest wordt groep 1 individueel subcutaan geïnjecteerd met [REDACTED] van het controle sample en de test groep individueel subcutaan geïmmuniseerd met [REDACTED] van het test sample, zoals voorgeschreven in de Ph.Eur.

Gedurende 3 weken worden alle dieren geobserveerd op verschijnselen van algehele malaise en ongerief. Tevens worden de dieren wekelijks gewogen. Aan het einde van de dierproef worden de dieren geëuthanaseerd (KR gevolgd door Pentobarbital). Als de dieren gedurende de hele proef geen [REDACTED] gerelateerde ziekteverschijnselen vertonen, er geen gewichtsverlies geconstateerd wordt en er geen dieren sterven voldoet het tetanus toxoïd aan de veiligheidseisen en kan het worden vrijgegeven voor het [REDACTED] vaccin, zowel voor humaan als veterinair gebruik

Test 3: Veiligheidsbepaling [REDACTED]

Op de dag van aankomst worden de dieren gewogen en gemerkt (d.m.v. kleuring). Daarna krijgen de dieren minimaal 1 week te tijd om te acclimatiseren. De test bestaat uit één groep van 5 vrouwelijke cavia's. Het startgewicht van de cavia's ligt tussen de 250-350 gram. Op dag 0 worden de dieren individueel subcutaan geïnjecteerd met [REDACTED] de humane dosis van het te testen vaccin [REDACTED]. Gedurende 3 weken worden alle dieren geobserveerd op verschijnselen van algehele malaise en ongerief. Tevens worden de dieren wekelijks gewogen. Aan het einde van de dierproef worden de dieren geëuthanaseerd (KR gevolgd door Pentobarbital). Als de dieren gedurende de hele proef geen [REDACTED] ziekteverschijnselen vertonen, er geen gewichtsverlies geconstateerd wordt en er geen dieren sterven voldoet het [REDACTED] aan de veiligheidseisen en kan het worden vrijgegeven voor humaan gebruik.

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

Deze bijlage beschrijft 3 testen. Per te testen sample zijn er voor **test 1** vijf cavia's, voor **test 2** tien cavia's en voor **test 3** vijf cavia's nodig. Deze aantallen worden wettelijk voorgeschreven volgens de Ph. Eur. Een statistische analyse c.q. power analyse is niet mogelijk.

B. De dieren

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

Voor deze dierproeven worden cavia's gebruikt afkomstig van binnenlands /buitenlands geregistreerde fok. Het betreft cavia's van 1 sexe die tussen de 250-350 gram wegen bij aanvang van de drie testen..

Per te testen [REDACTED] nodig [REDACTED]. Er worden circa [REDACTED] testen ingezet binnen een periode van [REDACTED]. Dit brengt het totaal gebruik aan proefdieren op [REDACTED].

Per te testen [redacted] zijn [redacted] nodig [redacted] Voor een periode van [redacted]
[redacted] komt dit neer op [redacted] brengt het totaal gebruik aan proefdieren op [redacted]

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.

Veiligheidsonderzoeken [redacted]
[redacted] Er is nog geen geaccepteerd alternatief voorhanden. Momenteel neemt [redacted] deel aan een ringstudy om een *in vitro* alternatief te ontwikkelen voor het bepalen van de veiligheid [redacted]

[redacted] Er wordt niet verwacht dat er binnen 5 jaar een volwaardig alternatief goedgekeurd is door EDQM. Mocht dit wel het geval zijn, zullen wij kijken naar de mogelijkheden om deze te implementeren.

Het veiligheidsonderzoek voor [redacted] middels een *in vivo* experiment wordt voorgeschreven door [redacted] Er is nog geen geaccepteerd alternatief voorhanden. Het is nog onduidelijk of het hierboven beschreven alternatief ook toepasbaar is op [redacted] vaccins. [redacted]

Het verminderen van het aantal dieren per dier test is voor alle diertesten niet mogelijk. De aantallen worden per diertest voor geschreven door de Ph.Eur. Hiervan afwijken, leidt tot invalide testen. De producten [redacted] kunnen dan onmogelijk worden vrijgegeven voor vaccin productie of vaccin gebruik (zowel humane als veterinaire doeleinden).

Op het gebied van verfijning wordt al het mogelijke gedaan. Bij alle drie de testen wordt gedurende de hele dierproef (3 weken) kooiverrijking toegepast. Het subcutaan injecteren vindt vanwege het volume plaats in de nek en het euthanaseren van de dieren zijn handelingen die fysiek ongerief veroorzaken bij de

dieren. Dit injecteren en euthanaseren wordt door getraind en bekwaam personeel uitgevoerd. Dit beperkt het ongerief dat de dieren ondervinden.

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.

Deze testen wordt regulier uitgevoerd voor het veilig verklaren van [REDACTED] vaccins. Dit leidt tot vrijgifte van [REDACTED] voor vaccin productie en vrijgifte van [REDACTED] vaccins. Het subcutaan injecteren en het euthanaseren van de dieren zijn handelingen welke mogelijk fysiek ongerief kunnen veroorzaken bij de dieren. Dit injecteren en euthanaseren wordt door getraind en bekwaam personeel uitgevoerd. Op deze manier worden pijn, lijden of angst tot een minimum beperkt.

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.

Wettelijk is het verplicht om van elk nieuw geproduceerde [REDACTED] en batch [REDACTED] vaccin de veiligheid te bepalen middels deze dierproeven. Daarnaast worden op [REDACTED] vaccins als eindproduct ook stabiliteitsstudies uitgevoerd. Een goedgekeurd en vrijgegeven [REDACTED] hoeft niet opnieuw getest te worden. Wanneer meer dan 1 cavia sterft tijdens de observatieperiode voor test 1, 2 of 3, door een a-specifieke oorzaak mag de test eenmalig herhaald worden. Wanneer tijdens deze herhaling meer dan 1 dier sterft, zal het [REDACTED] vaccin afgekeurd worden.

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 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.

Já

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting verwacht.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Nvt

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

Nvt

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 ongeriefsclassificatie voor alle dierproeven is 'licht'. Het subcutaan injecteren veroorzaakt ongerief bij de dieren. De euthanasie methode wordt uitgevoerd onder anesthesie (Ketamine + Xylazine gevolgt door Pentobarbital). Dit veroorzaakt licht ongerief.

Er bestaat een kleine kans dat er [REDACTED] aanwezig zijn in het [REDACTED] [REDACTED] als dit het geval is zullen de dieren ziek worden en valt de ongeriefsclassificatie hoger uit. Het is zeer onwaarschijnlijk dat dit gebeurt, dit is namelijk nog niet eerder voorgekomen in voorgaande testen.

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.

Na immunisatie met [REDACTED] zijn de dieren niet meer geschikt voor andere doeleinden. Om deze reden worden alle dieren aan het einde van de dierproef geëuthanaseerd.

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.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	32600				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Intravacc				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><tr><td>Volgnummer</td><td>Type dierproef</td></tr><tr><td>6</td><td>Veiligheidsonderzoek op [REDACTED]</td></tr></table>	Volgnummer	Type dierproef	6	Veiligheidsonderzoek op [REDACTED]
Volgnummer	Type dierproef					
6	Veiligheidsonderzoek op [REDACTED]					

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 document beschrijft het veiligheidsonderzoek conform wet- en regelgeving van de Europese Farmacopee (Ph.Eur) voor het [REDACTED]. In deze test worden dieren geïnjecteerd met 1 concentratie van het te testen vaccin. Gedurende dit experiment worden de dieren op welzijn geobserveerd en worden ze wekelijks gewogen. Als de dieren gedurende de hele proef geen vaccin-gerelateerde ziekteverschijnselen vertonen, er geen gewichtsverlies geconstateerd wordt en er geen dieren sterven voldoet het [REDACTED] aan de veiligheidseisen en kan het worden vrijgegeven voor humaan gebruik.

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.

Op de dag van aankomst worden de dieren gewogen en gemerkt (door middel van een kleuring). Daarna krijgen de dieren minimaal 1 week de tijd om te acclimatiseren. De test bestaat uit één groep van 5 vrouwelijke cavia's. Het start gewicht van de cavia's ligt tussen de 250-350 gram. Op dag 0 worden de dieren individueel subcutaan geïmmuniseerd in de nekplooi met [REDACTED] humane dosis van het te testen vaccin [REDACTED]. Gedurende 6 weken worden alle dieren geobserveerd op verschijnselen van algehele malaise en ongerief. Tevens worden de dieren wekelijks gewogen (gewichtstoe- of afname is een meetbare parameter van het welzijn van de dieren). Aan het einde van de dierproef worden de dieren geëuthanaseerd (KX gevolgd door pentobarbital). Als de dieren gedurende de hele proef geen vaccin-gerelateerde ziekteverschijnselen vertonen, er geen gewichtsverlies geconstateerd wordt en er geen dieren sterven voldoet het [REDACTED] aan de veiligheidseisen en kan het worden vrijgegeven voor humaan gebruik.

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

Per test worden 5 dieren gebruikt (wettelijk voorgeschreven volgens Europese Farmacopee, Ph.Eur.). Een statistische analyse c.q. power analyse is niet mogelijk.

B. De dieren

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

Voor deze dierproef worden cavia's gebruikt afkomstig van binnenlands /buitenlands geregistreerde fok. Het betreft vrouwelijke cavia's die tussen de 250-350 gram wegen bij aanvang van de test. Gezien de duur van deze test en voorkeur voor gezamenlijke huisvesting van de cavia's (cavia's zijn sociale dieren) worden vrouwelijke dieren gebruikt voor dit experiment. Deze dieren zullen niet gaan vechten om de sociale rangorde te bepalen wanneer ze een langere periode (in dit geval 6 weken) samen zijn.

Per test sample/vaccin zijn 5 dieren nodig [REDACTED]. Er worden circa [REDACTED] per jaar ingezet met in totaal [REDACTED] proefdieren per jaar. [REDACTED]

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.

Veiligheidsonderzoek voor [REDACTED] middels een *in vivo* experiment wordt voorgeschreven door de Ph.Eur. paragraaf [REDACTED]. Er is nog geen geaccepteerd alternatief voorhanden. Voor de [REDACTED] is wel een *in vitro* assay beschikbaar [REDACTED]. Deze test is alleen in staat om de veiligheid van het [REDACTED] te bepalen. [REDACTED] beschikt naast het [REDACTED] ook het [REDACTED]. Tevens is de matrix geheel anders omdat het [REDACTED] geadjuveerd is. Om deze reden is de [REDACTED] assay niet meer bruikbaar als veiligheidstest voor dit [REDACTED].

Deze test wordt regulier uitgevoerd om de veiligheid van [REDACTED] te bepalen. Een vermindering van het aantal dieren per te testen vaccin is niet mogelijk. Wet- en regelgeving schrijven voor dat er per test vaccin minimaal 5 dieren gebruikt 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.

Op het gebied van verfijning is al het mogelijke gedaan. Voor de huisvesting is kooiverrijking toegepast gedurende de hele dierproef (6 weken). Het subcutaan injecteren wat plaats vindt in de nek, en het euthanaseren van de dieren zijn handelingen die fysiek ongerief kunnen veroorzaken bij de dieren. Dit injecteren en euthanaseren wordt door getraind en bekwaam personeel uitgevoerd. Op deze manier worden pijn, lijden of angst tot een minimum beperkt.

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.

Wettelijk is het verplicht om van elk nieuw geproduceerde vaccin batch (elke vaccin batch is uniek) de veiligheid te bepalen middels een dierproef. Elke vaccin batch wordt slechts eenmaal getest. Wanneer meer dan 1 cavia sterft tijdens de observatieperiode mag de test eenmalig herhaald worden. Wanneer tijdens deze herhaling meer dan 1 dier sterft, zal het [REDACTED] [REDACTED] vaccin afgekeurd worden.

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?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting verwacht.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Nvt

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

Nvt

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 ongerief classificatie voor de hele dierproef is 'licht'. Het subcutaan immuniseren kan ongerief bij de dieren veroorzaken. De euthanasie methode (Ketamine + Xylazine gevolgd door Pentobarbitalveroorzaakt licht ongerief. Er bestaat een kleine kans dat er [REDACTED] aanwezig zijn in het [REDACTED], als dit het geval is zullen de dieren ziek worden en valt de ongeriefsclassificatie hoger uit. Het is zeer onwaarschijnlijk dat dit gebeurt, in de afgelopen decennia dit is namelijk niet voorgekomen in voorgaande testen.

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.

Na injectie met [REDACTED] de humane dosis van [REDACTED] zijn de dieren niet meer geschikt voor andere doeleinden. aangezien de dieren geïnjecteerd zijn met biologische agentia. Daarnaast zullen de dieren niet meer voldoen aan de strenge gewichtseisen die aan deze dierproef gesteld worden Aan het einde van de dierproef worden om deze reden alle dieren geëuthanaseerd.

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.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	32600				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Intravacc				
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>7</td><td>Veiligheidsonderzoek op [redacted] vaccins [redacted]</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	7	Veiligheidsonderzoek op [redacted] vaccins [redacted]
Volgnummer	Type dierproef					
7	Veiligheidsonderzoek op [redacted] vaccins [redacted]					

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 document beschrijft het veiligheidsonderzoek conform wet- en regelgeving van de Europese Farmacopee (Ph.Eur.) voor Whole Cell Kinkhoest (bevattende vaccins, zie Ph.Eur. Pertussis vaccine [redacted])

[redacted] vaccins worden geproduceerd d.m.v. het opkweken van [redacted] vaccins bevatten veel verschillende antigeen epitopen die nodig zijn om bescherming te bieden tegen een [redacted] infectie. De belangrijkste antigenen zijn [redacted] en [redacted]. Het [redacted] wordt chemisch geïnactiveerd [redacted] mag niet in te hoge concentraties aanwezig zijn omdat deze component

bijwerkingen kan veroorzaken. [redacted] vaccins alsmede combinatievaccins die [redacted] bevatten veilig zijn en niet te veel bijwerkingen veroorzaken [redacted] of andere verontreinigingen). In deze test worden dieren geïnjecteerd met 1 concentratie van het te testen vaccin. Gedurende dit experiment worden de dieren op welzijn geobserveerd en worden de dieren gewogen. Als er voldaan wordt aan de volgende eisen dan wordt het vaccin veilig bevonden en kan het worden vrijgegeven.

- Na 3 dagen mag het totale gewicht van de testgroep muizen niet lager zijn dan voor inspuiting
- Na 7 dagen dient de gemiddelde gewichtstoename van de testgroep muizen minstens 60% van de gewichtstoename van de controle dieren te zijn, die op overeenkomstige wijze zijn ingespoten met een fysiologische zoutoplossing
- Er mag niet meer dan 5% van de dieren sterven gedurende de gehele dierproef. Als er 1 muis sterft mag de test herhaald worden maar dan met 15 muizen in de test groep. De controle groep hoeft niet herhaald te worden.

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.

Deze test bestaat uit 1 testgroep van 5 muizen en 1 controlegroep van 5 muizen. De muizen worden gemerkt en individueel gewogen. De 5 muizen uit de testgroep worden intraperitoneaal geïnjecteerd met [redacted] van het te testen vaccin welke een [redacted] bevat van het te testen [redacted]. De 5 controlemuizen worden intraperitoneaal geïnjecteerd met [redacted] fysiologisch zout. Op dag 0 worden de dieren eerst individueel gewogen en daarna geïnjecteerd. Tevens worden op dag 3 en 7 de dieren individueel gewogen. Dag 7 is het einde van het experiment waarbij de dieren geëthanaseerd (CO_2 / O_2) worden. Als er aan bovenstaande eisen voldaan wordt, dan wordt het vaccin veilig bevonden en kan het worden vrijgegeven.

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

Per test worden 2 groepen van 5 dieren gebruikt (wettelijk voorgeschreven door Europese Farmacopee, Ph. Eur.). Een statistische analyse c.q. power analyse is niet mogelijk.

B. De dieren

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

Voor deze dierproef worden muizen gebruikt afkomstig van binnenlands /buitenlands geregistreerde fok. Het betreft muizen van 1 sexe (geen voorkeur voor mannelijke of vrouwelijke dieren) per proef en wegen tussen de 14-16 gram bij aanvang van de test.

Per test sample/vaccin zijn 10 dieren nodig [redacted]. Er worden [redacted] verwacht gedurende de komende [redacted]. Het totale gebruik van proefdieren komt uit op [redacted]. Waar mogelijk zullen test vaccins gecombineerd worden om controle dieren te besparen.

Indien er 1 dier tijdens de test sterft, mag de test herhaald worden met, in geval van een combinatievaccin, 15 additionele muizen (de controle groep hoeft niet herhaald te worden.) Naar verwachting zal dit bij niet meer dan 2 testen [redacted]. Voor deze 2 additionele testen worden [redacted] extra dieren ingecalculleerd d. Dit brengt het totale verwachte benodigde aantal proefdieren op [redacted] dieren.

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.

Veiligheidsonderzoek op [REDACTED] middels een *in vivo* experiment wordt voorgeschreven door [REDACTED]. Er is nog geen geaccepteerd en gevalideerd alternatief voorhanden.

Deze test wordt uitgevoerd voor het veilig verklaren van [REDACTED] leidt tot uiteindelijke vrijgave van deze vaccins. Een vermindering van het aantal dieren per te testen vaccin is niet mogelijk. Wet- en regelgeving schrijven voor dat er per test vaccin minimaal 10 dieren (2 groepen van 5 dieren) gebruikt worden. Op het gebied van verfijning is al het mogelijke gedaan. Voor de huisvesting is kooiverrijking toegepast gedurende de hele dierproef. Het intraperitoneaal injecteren en het euthanaseren van de dieren zijn handelingen die fysiek ongerief kunnen veroorzaken bij de dieren. Dit injecteren en euthanaseren wordt door getraind en bekwaam personeel uitgevoerd. Ook dit verlaagt het ongerief en verhoogd de verfijning van deze dierproef.

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.

Het intraperitoneaal injecteren en het euthanaseren van de dieren zijn handelingen die fysiek ongerief veroorzaken bij de dieren. Dit injecteren en euthanaseren wordt door getraind en bekwaam personeel uitgevoerd. Op deze manier worden pijn, lijden of angst tot een minimum beperkt.

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.

Wettelijk is het verplicht om van elk nieuw geproduceerde vaccin batch (elke vaccin batch is uniek) de veiligheid te bepalen middels een dierproef. Elke vaccin batch wordt slechts eenmaal getest en wordt in principe niet herhaald. De test mag alleen herhaald worden als er 1 dier van de test groep sterft. De test mag dan éénmalig herhaald worden met 15 dieren per groep. De test resultaten moeten dan gecombineerd worden. Als alle dieren blijven leven, maar

er wordt niet voldaan aan de overige eisen (gewichtseisen) dan wordt het vaccin afgekeurd.

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?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting verwacht.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Nvt.

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

Nvt.

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 ongerief classificatie voor de hele dierproef is 'licht'. Het intraperitoneaal immuniseren kan ongerief bij de dieren veroorzaken. Er bestaat een kleine kans dat [REDACTED] een andere verontreiniging aanwezig is in [REDACTED] vaccin. Wanneer dit het geval is zullen de dieren ziek worden en valt de ongeriefsclassificatie hoger uit. Het is zeer onwaarschijnlijk dat dit gebeurt, in de afgelopen decennia dit is namelijk niet voorgekomen in voorgaande testen.

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.

Na injectie met ██████████ van het ██████████ zijn de dieren niet meer geschikt voor andere doeleinden. Als de dieren een immuunrespons opwekken dan zullen de dieren antilichamen maken tegen alle componenten van het ██████████. Deze opgebouwde titer van diverse antilichamen kunnen de resultaten van een tweede dierproef, waaraan deze dieren deelnemen verstoren. Om deze reden worden alle dieren aan het einde van de dierproef geëuthanaseerd. Daarnaast zullen de dieren niet meer voldoen aan de strenge gewichtseis van 14-16gram die aan deze dierproef gesteld wordt.

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.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	32600				
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Intravacc				
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>8</td><td>Veiligheidsonderzoek op abnormale toxiciteit; experiment in muizen (bij nieuw ontwikkeld vaccin of afwijking in het productieproces)</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	8	Veiligheidsonderzoek op abnormale toxiciteit; experiment in muizen (bij nieuw ontwikkeld vaccin of afwijking in het productieproces)
Volgnummer	Type dierproef				
8	Veiligheidsonderzoek op abnormale toxiciteit; experiment in muizen (bij nieuw ontwikkeld vaccin of afwijking in het productieproces)				

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Dit document beschrijft het veiligheidsonderzoek conform wet- en regelgeving van de Europese Farmacopee (Ph.Eur) op abnormale toxiciteit van vaccins, zie Ph.Eur. paragraaf 2.6.9. Abnormal Toxicity 01/2008:20609. Deze paragraaf schrijft een test voor in muizen en een test in cavia's. Beide diertesten zijn onderdeel van onderzoek op abnormale toxiciteit en worden uitgevoerd voor elk nieuw ontwikkeld vaccin en bij veranderingen en/of onverwachte afwijkingen in het productieproces. Wanneer consistentie van het productieproces is aangetoond en goedkeuring van de autoriteiten is verkregen, kan deze test komen te vervallen. De abnormale toxiciteitsbepaling wordt niet meer uitgevoerd voor vaccins ████████ of van externe partijen. ██████ en andere partijen beschikken

over een consistent productieproces van hun vaccins. Helaas komt het incidenteel voor dat tijdens het productieproces een afwijking optreedt. Dit is een risico voor elke vaccin producent. Om de veiligheid van een vaccin met een afwijking te garanderen zijn er additionele veiligheidstesten nodig, zoals een abnormale toxiciteitsbepaling om de veiligheid van het betreffende vaccin te garanderen. Deze test wordt uitgevoerd op verzoek van de Qualified Person (QP) en eventueel in overleg met de autoriteiten. Deze bijlage omschrijft het abnormale toxiciteitsonderzoek in muizen.

In deze test worden 5 muizen geïnjecteerd met 1 humane dosis van het te testen vaccin. Gedurende dit experiment (1 week) worden de dieren op welzijn geobserveerd en worden ze 2 maal gewogen (begin en einde van de test). Wanneer het welzijn van de dieren niet aangetast wordt, er geen gewichtsverlies geconstateerd wordt en er geen dieren sterven voldoet het vaccin aan de veiligheidseisen en kan het worden vrijgegeven. Wanneer er 1 dier sterft of ziekteverschijnselen vertoont, mag de test herhaald worden. Tijdens deze herhaling mag geen van de dieren ziekteverschijnselen vertonen of sterven.

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.

Voor deze test zijn 5 muizen nodig, van 17 – 24 gram, geslacht 1 sexe (er is geen voorkeur voor het geslacht). Op dag 0 worden de dieren individueel gemerkt en gewogen en worden de dieren onderzocht op ziekteverschijnselen. Als alle dieren gezond zijn dan worden de muizen intraperitoneaal geïnjecteerd met 1 humane dosis van het te testen vaccin (max. volume testvaccin is 1 ml). Gedurende 7 dagen worden alle dieren geobserveerd op algeheel welzijn en mogelijke ziekteverschijnselen. Op dag 7 worden de dieren nogmaals gewogen (gewichtstoe- of afname is een meetbare parameter van het welzijn van de dieren). Aan het einde van de dierproef worden de dieren geëuthanaseerd. Wanneer het welzijn van de dieren gedurende het hele dierexperiment niet aangetast wordt, er geen gewichtsverlies geconstateerd wordt en er geen dieren sterven voldoet het vaccin aan de veiligheidseisen en kan het worden vrijgegeven. Wanneer er 1 dier sterft of ziekteverschijnselen vertoont mag de test herhaald worden. Tijdens deze herhaling mag geen van de dieren ziekteverschijnselen vertonen of sterven.

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

Per test worden 5 muizen gebruikt (wettelijk voorgeschreven volgens Europese Farmacopee, Ph. Eur.). Een statistische analyse c.q. power analyse is niet mogelijk.

B. De dieren

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

Voor deze dierproef worden muizen afkomstig van binnenlands /buitenlands geregistreerde fok. De muizen wegen 17 – 24 gram bij start van het experiment. De muizen zijn van 1 sexe.

Per test/vaccin zijn er 5 muizen nodig. Het is moeilijk in te schatten hoeveel abnormale toxiciteitstesten er ingezet gaan worden over een periode van 5 jaar, aangezien deze test hoofdzakelijk bij een productieafwijking uitgevoerd wordt. Het aantal te verwachte testen is geschat op 4, gedurende de looperperiode (5 jaar) van dit project. Voor een periode van 5 jaar komt het gebruik aan proefdieren op 20 muizen.

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.

Wanneer er een additioneel veiligheidsonderzoek op abnormale toxiciteit vereist is, wordt dit onderzoek uitgevoerd middels een *in vivo* experiment welke wordt voorgeschreven door de Ph. Eur. paragraaf 01/2008:20609. Er is nog geen geaccepteerd alternatief voorhanden.

Deze test wordt incidenteel uitgevoerd (bij afwijkingen in het productieproces) voor het testen van de veiligheid van vaccins wat kan leiden tot uiteindelijke vrijgifte van het vaccin. Ook kan deze test worden ingezet voor het testen van een nieuw vaccin of een bestaand vaccin met een andere formulering. Een vermindering van het aantal dieren per te testen vaccin is niet mogelijk. Wet- en regelgeving schrijven voor dat er per test vaccin minimaal 5 dieren gebruikt worden. Op het gebied van verfijning wordt het volgende toegepast. Gedurende de gehele dierproef wordt voor de huisvesting kooiverrijking toegepast. Daarnaast zal deze dierproef sequentieel worden ingezet. Het intraperitoneaal injecteren + euthanaseren (CO₂ / O₂) van de dieren zijn handelingen die fysiek ongerief kunnen veroorzaken bij de dieren. Het injecteren en euthanaseren wordt door getraind en bekwaam personeel uitgevoerd en daarmee wordt de het ongerief dat de dieren ondervinden beperkt.

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.

Het intraperitoneaal injecteren + euthanaseren (CO₂ / O₂) van de dieren zijn handelingen die fysiek ongerief veroorzaken bij de dieren. Dit injecteren en euthanaseren wordt door getraind en bekwaam personeel uitgevoerd. Op deze manier worden pijn, lijden of angst tot een minimum beperkt.

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.

Wet- en regelgeving schrijven deze test voor bij elk nieuw ontwikkeld vaccin en bij vaccins met een nieuwe formulering om de veiligheid van deze producten te bepalen (totdat aangetoond is dat het productieproces consistent is). Tevens wordt deze test gebruikt voor het vrijgeven van vaccins waarbij een afwijking is voorkomen in het productieproces. Experimenten met dezelfde vaccins worden niet herhaald. Een goedgekeurd en vrijgegeven vaccin hoeft niet opnieuw getest te worden.

Als er tijdens het experiment 1 dier sterft of ziekteverschijnselen vertoont, dan mag de test herhaald worden. Als er in de herhaling 1 of meer dieren

ziekteverschijnselen vertonen of sterven wordt het vaccin afgekeurd.

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?

Het kan zijn dat de dieren na toediening van een vaccin licht ongerief ervaren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Er kunnen verschillende type vaccins getest worden in deze test. Het is op voorhand niet te voorspellen wat de oorzaak zal zijn bij eventuele welzijnsaantasting.

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

Het voorkomen of minimaliseren van dit soort schadelijke effecten is niet mogelijk.

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 ongerief classificatie voor de hele dierproef is 'licht'. Het intraperitoneaal injecteren kan licht ongerief bij de dieren veroorzaken. De euthanasiemethode veroorzaakt licht ongerief. Ongerief kan ook veroorzaakt worden door abnormale toxische componenten in het te testen vaccin; de aanwezigheid van dergelijke componenten wordt echter niet verwacht.

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.

Na injectie met 1 humane dosis van het te onderzoeken vaccin zijn de dieren niet meer geschikt voor andere doeleinden. Wanneer het vaccin een immuunrespons opwekt, zullen de dieren antilichamen maken tegen alle componenten van het te testen vaccin. Deze opgebouwde titer van diverse antilichamen kunnen de resultaten van een tweede dierproef, waaraan deze dieren deelnemen verstoren. Om deze reden worden alle dieren aan het einde van de dierproef geëuthanaseerd.

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.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	32600				
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Intravacc				
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>9</td><td>Veiligheidsonderzoek op abnormale toxiciteit; cavia experiment. (bij nieuw ontwikkeld vaccin of afwijking in het productieproces)</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	9	Veiligheidsonderzoek op abnormale toxiciteit; cavia experiment. (bij nieuw ontwikkeld vaccin of afwijking in het productieproces)
Volgnummer	Type dierproef				
9	Veiligheidsonderzoek op abnormale toxiciteit; cavia experiment. (bij nieuw ontwikkeld vaccin of afwijking in het productieproces)				

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Dit document beschrijft het veiligheidsonderzoek conform wet- en regelgeving van de Europese Farmacopee (Ph.Eur) op abnormale toxiciteit van vaccins, zie Ph.Eur. paragraaf 2.6.9. Abnormal Toxicity 01/2008:20609. Deze paragraaf schrijft een test voor in muizen en een test in cavia's. Beide diertesten zijn onderdeel van onderzoek op abnormale toxiciteit en worden uitgevoerd voor elk nieuw ontwikkeld vaccin en bij veranderingen en/of onverwachte afwijkingen in het productieproces. Wanneer consistentie van het productieproces is aangetoond en goedkeuring van de autoriteiten is verkregen, kan deze test komen te vervallen. De abnormale toxiciteitstest wordt niet meer uitgevoerd voor [REDACTED] of van externe partijen. [REDACTED] en andere partijen beschikken over

een consistent productieproces van hun vaccins. Helaas komt het incidenteel voor dat tijdens het productieproces een afwijking optreedt. Dit is een risico voor elke vaccin producent. Om de veiligheid van een vaccin met een afwijking te garanderen zijn er additionele veiligheidstesten nodig, zoals een abnormale toxiciteitsbepaling om de veiligheid van het betreffende vaccin te garanderen. Deze test wordt uitgevoerd op verzoek van de Qualified Person (QP) en eventueel in overleg met de autoriteiten. Deze bijlage omschrijft het abnormale toxiciteitsonderzoek in cavia's.

In deze test worden 2 cavia's per test vaccin geïnjecteerd met 1 humane dosis van het te testen vaccin. Gedurende dit experiment (1 week) worden de dieren op welzijn geobserveerd en worden ze 2 maal gewogen (begin en einde van de test). Wanneer het welzijn van de dieren niet aangetast wordt, er geen gewichtsverlies geconstateerd wordt en er geen dieren sterven voldoet het vaccin aan de veiligheidseisen en kan het worden vrijgegeven. Wanneer er 1 dier sterft of ziekteverschijnselen vertoont, mag de test herhaald worden. Tijdens deze herhaling mag geen van de dieren ziekteverschijnselen vertonen of sterven.

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.

Voor deze test zijn 2 cavia's nodig van 250 – 400 gram, geslacht 1 sexe (er is geen voorkeur voor het geslacht). Op dag 0 worden de dieren individueel gewogen en gemerkt en worden de dieren onderzocht op ziekteverschijnselen. Als beide dieren gezond zijn dan worden de cavia's intraperitoneaal geïnjecteerd met 1 humane dosis van het te testen vaccin (max. volume testvaccin is 5 ml). Gedurende 7 dagen worden alle dieren geobserveerd op algeheel welzijn en mogelijke ziekteverschijnselen. Op dag 7 worden de dieren nogmaals gewogen (gewichtstoe- of afname is een meetbare parameter van het welzijn van de dieren). Aan het einde van de dierproef worden de dieren geëuthanaseerd. Wanneer het welzijn van de dieren gedurende de hele dier test niet aangetast wordt, er geen gewichtsverlies geconstateerd wordt en er geen dieren sterven voldoet het vaccin aan de veiligheidseisen en kan het worden vrijgegeven. Als er 1 dier sterft of ziekteverschijnselen vertoont mag de test herhaald worden. Tijdens deze herhaling mag geen van de dieren ziekteverschijnselen vertonen of sterven.

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

Per test worden 2 dieren gebruikt (wettelijk voorgeschreven volgens Europese Farmacopee, Ph. Eur.). Een statistische analyse c.q. power analyse is niet mogelijk.

B. De dieren

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

Voor deze dierproef worden cavia's gebruikt afkomstig van binnenlands /buitenlands geregistreerde fok. De cavia's wegen tussen de 250-400 gram bij start van de experimenten. De cavia's zijn van 1 sexe.

Per test/vaccin worden er 2 cavia's gebruikt. Het is moeilijk in te schatten hoeveel abnormale toxiciteitstesten er ingezet gaan worden over een periode van 5 jaar, aangezien deze test hoofdzakelijk bij een productieafwijking uitgevoerd wordt. Het aantal te verwachte testen is geschat op 4, gedurende de loopperiode (5 jaar) van dit project. Voor een periode van 5 jaar komt het gebruik aan proefdieren op 8 cavia's

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.

Wanneer er een additioneel veiligheidsonderzoek op abnormale toxiciteit vereist is, wordt dit onderzoek uitgevoerd middels een *in vivo* experiment welke wordt voorgeschreven door de Ph. Eur. paragraaf 01/2008:20609. Er is nog geen geaccepteerd alternatief voorhanden.

Deze test wordt incidenteel uitgevoerd (bij afwijkingen in het productieproces) voor het testen van de veiligheid van vaccins wat kan leiden tot uiteindelijke vrijgifte van het vaccin. Ook kan deze test worden ingezet voor het testen van een nieuw vaccin of een bestaand vaccin met een andere formulering. Een vermindering van het aantal dieren per te testen vaccin is niet mogelijk. Wet- en regelgeving schrijven voor dat er per test vaccin minimaal 2 gebruikt worden. Op het gebied van verfijning wordt het volgende toegepast. Gedurende de gehele dierproef wordt voor de huisvesting kooiverrijking toegepast. Daarnaast zal deze dierproef sequentieel worden ingezet. Het intraperitoneaal injecteren + euthanaseren (KR gevolgd door Pentobarbital) van de dieren zijn handelingen die fysiek ongerief kunnen veroorzaken bij de dieren. Het injecteren en euthanaseren wordt door getraind en bekwaam personeel uitgevoerd en daarmee wordt de het ongerief dat de dieren ondervinden beperkt.

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.

Het intraperitoneaal injecteren (immunisatie) + euthanaseren (KR gevolgd door Pentobarbital) van de dieren zijn handelingen die fysiek ongerief veroorzaken bij de dieren. Dit injecteren en euthanaseren wordt door getraind en bekwaam personeel uitgevoerd. Op deze manier worden pijn, lijden of angst tot een minimum beperkt.

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.

Wet- en regelgeving schrijven deze test voor bij elk nieuw ontwikkeld vaccin en bij vaccins met een nieuwe formulering om de veiligheid van deze producten te bepalen (totdat aangetoond is dat het productieproces consistent is). Tevens wordt deze test gebruikt voor het vrijgeven van vaccins waarbij een afwijking is voorkomen in het productieproces. Experimenten met dezelfde vaccins worden niet herhaald. Een goedgekeurd en vrijgegeven vaccin hoeft niet opnieuw getest te worden.

Als er tijdens het experiment 1 dier sterft of ziekteverschijnselen vertoond, dan mag de test herhaald worden. Als er in de herhaling 1 of meer dieren ziekteverschijnselen vertonen of sterven wordt het vaccin afgekeurd.

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?

Het kan zijn dat de dieren na toediening van een vaccin licht ongerief ervaren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Er kunnen verschillende type vaccins getest worden in deze test. Het is op voorhand niet te voorspellen wat de oorzaak zal zijn bij eventuele welzijnsaantasting.

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

Het voorkomen of minimaliseren van dit soort schadelijke effecten is niet mogelijk.

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 ongerief classificatie voor de hele dierproef is 'licht'. Het intraperitoneaal injecteren kan licht ongerief bij de dieren veroorzaken. De euthanasiemethode veroorzaakt licht ongerief. Ongerief kan ook veroorzaakt worden door abnormale toxische componenten in het te testen vaccin; de aanwezigheid van dergelijke componenten wordt echter niet verwacht

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.

Na injectie met 1 humane dosis van het te onderzoeken vaccin zijn de dieren niet meer geschikt voor andere doeleinden. Wanneer het vaccin een immuunrespons opwekt, zullen de dieren antilichamen maken tegen alle componenten van het te testen vaccin

Deze opgebouwde titer van diverse antilichamen kunnen de resultaten van een tweede dierproef, waaraan deze dieren deelnemen verstoren. Om deze

reden worden alle dieren aan het einde van de dierproef geëuthanaseerd.

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

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer
2. Titel van het project: **Bepalen veiligheid van bulkproducten voor vaccins tot en met het vaccin als eindproduct**
3. Titel van de NTS: **Bepalen veiligheid van grondstoffen voor vaccins tot en met het vaccin als eindproduct**
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning**
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: **DEC-Alt**
 - telefoonnummer contactpersoon: XXXXXXXXXX
 - mailadres contactpersoon: XXXXXXXXXX
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: **30-10-2015**
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: **05-11-2015**
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van / tot: **06-11-2015 / 17-11-2015**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD: **30-11-2015**
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum: **05-11-2015**
 - Plaats: **Bilthoven**
 - Aantal aanwezige DEC-leden: **7**
 - Aanwezige (namens) aanvrager: **verantwoordelijk onderzoeker**
 - 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: **05-11-2015**

Strekking van de vraag / vragen:

1. In sommige bijlagen worden meerdere type dierproeven beschreven. De DEC-ALt is van mening dat dit in strijd is met de eis die de CCD stelt (1 type dierproef per bijlage). De DEC-ALt heeft de onderzoekers geadviseerd om de betreffende bijlagen te splitsen.

2. In bijlage 1, punt B (Dieren) is de status van de moederdieren niet duidelijk (behoren ze wel of niet tot de dierproef). Aan de onderzoekers is verzocht dit te verduidelijken.

3. In de NTS is de eerste vraag onder het kopje "Verfijning" (punt 4.3) onjuist beantwoord. Het gegeven antwoord heeft betrekking op (en staat ook bij) de tweede vraag (Welke algemene maatregelen zijn genomen). De vraag naar de keuze van de diersoort en naar een verklaring voor het gekozen diermodellen dient nog beantwoord te worden.

- Datum antwoord: **17 –11-2015**
- Strekking van het (de) antwoord(en):

Ad 1. De betreffende bijlages zijn gesplitst. Het hele project omvat nu 9 bijlagen.

Ad 2. De tekst betreffende de moederdieren is verduidelijkt. (zie bijlage 2, sectie B)

Ad 3. De vraag die gesteld wordt in de NTS onder 4.3 is nu correct beantwoord. (zie NTS)

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**.
2. Het project betreft een **nieuwe aanvraag**.
3. **De DEC-ALT heeft de competenties en de ervaring om te adviseren over dit project.**
4. **Eén lid van de DEC-Alt is betrokken geweest bij het opstellen van de vergunningaanvraag. Dit lid heeft zich teruggetrokken en is niet betrokken geweest bij het opstellen van dit advies.**

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is wettelijk vereist.
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie "wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie" is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC-ALT onderschrijft het belang van het testen van vaccins, bulkproducten en de working cell bank (WCB) op veiligheid voordat de vaccins klinisch toegepast worden. De dierproeven die in dit project beschreven staan, worden uitgevoerd volgens gestandaardiseerde protocollen die beschreven staan in de richtlijnen van de Europese Pharmacopae (EP). Hoewel het uitvoeren van deze testen wettelijk vereist is, zijn de dieraantallen niet statistisch onderbouwd en is de gevoeligheid van de gebruikte diermodellen onbekend. Uit historische data blijkt dat verontreiniging nog nooit is aangetoond in de producten van deze fabrikant. Echter, de gevolgen van een niet gedetecteerde verontreiniging zouden zeer ernstig kunnen zijn, aangezien de vaccins niet alleen toegediend worden aan gezonde mensen, maar ook kwetsbare individuen (denk hierbij aan baby's en ouderen). Gelet op het bovenstaande acht de DEC-ALT het belang van deze aanvraag substantieel. Het dierexperimenteel onderzoek heeft tot doel de veiligheid van vaccins te waarborgen. Hoewel de kans op een verontreiniging bijzonder klein is, kunnen de gezondheidsrisico's die eventueel gepaard zouden kunnen gaan met het vaccin geminimaliseerd worden door de dierproeven uit te voeren die in het project beschreven staan.

4. De DEC-Alt verwacht dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van de categorieën, omstandigheden of de behandeling van de dieren.
6. De DEC-Alt acht de mate van ongerief - licht en matig - realistisch ingeschat aangezien verontreinigingen in vaccins of WCB nog nooit zijn voorgekomen bij deze producent. Dientengevolge is het waarschijnlijk dat de dieren in dit project alleen ongerief zullen ondervinden van de injectie met het vaccin (licht), bijwerkingen van het ██████████ (matig) of van de intracerebrale injectie (matig).
7. Er zijn geen alternatieven voorhanden. De aanwezigheid van bepaalde, bekende verontreinigingen (bijvoorbeeld ██████████) zouden ook d.m.v. *in vitro* methoden (bijvoorbeeld qPCR) aangetoond kunnen worden. De onderzoekers hebben aangegeven actief op zoek te blijven naar dergelijke alternatieven en hebben ook aangegeven deel te nemen aan de ringstudies die in dit kader uitgevoerd worden. Verwacht wordt echter dat deze testen niet binnen de looptijd van het project geïmplementeerd zullen worden. Daarnaast zijn er in het project een aantal testen beschreven die tot doel hebben uit te sluiten dat er in het vaccin geheel onverwacht, onbekende verontreinigingen aanwezig zijn die gezondheidsrisico's met zich mee kunnen brengen. Het gaat hierbij om wettelijk vereiste testen waarvoor in de wet en regelgeving geen alternatief beschreven wordt.
8. Het gaat in dit project om wettelijk vereist onderzoek waarvoor het aantal dieren vastgelegd is in de daarvoor bestemde wet- en regelgeving. Het totaal aantal dierexperimenten is gebaseerd op historische data en een realistische toekomstverwachting met betrekking tot de vaccinproductie.
9. Het project is in overeenstemming met de vereisten van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. In het project zal kooiverrijking worden toegepast. De dieren zullen gemonitord worden en indien humane eindpunten worden bereikt, worden de dieren geëuthanaseerd. Er is geen sprake van substantiële negatieve milieu effecten.

10. De DEC-Alt heeft een kleine tekstuele wijzigingen voorgesteld maar is in het algemeen van mening dat de NTS begrijpelijk geformuleerd is en een evenwichtige samenvatting is van het project.

D. Ethische afweging

Op grond van de overwegingen in deel C van dit advies komt de DEC-Alt tot de volgende ethische afweging.

Het project heeft als doelstelling aan te tonen dat een bulkproduct of WCB, te gebruiken voor de productie van een vaccin, of het vaccin als eindproduct geen verontreinigingen bevat die de gezondheid van mensen kunnen schaden. Dit zijn wettelijk vereiste dierproeven. Er zijn geen alternatieven voorhanden die de dierexperimenten zoals beschreven in het projectvoorstel kunnen vervangen. De DEC-Alt acht het van substantieel belang dat de veiligheid van vaccins gewaarborgd wordt teneinde de gezondheid van de gevaccineerden niet in gevaar te brengen.

Tegenover dit belang staat dat de dieren licht of matig ongerief zullen ondervinden van de injectie, de te injecteren vloeistof en immunologische reacties. Toxiciteit of verontreinigingen die tot meer dan licht of matig ongerief zou kunnen leiden, zijn nog nooit waargenomen bij deze producent.

De DEC-Alt is van mening dat het belang van het waarborgen van de veiligheid van vaccins voor klinische toepassing opweegt tegen het ongerief dat de dieren zullen ondervinden als gevolg van de handelingen zoals beschreven in het projectvoorstel.

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

InTraVacc



Postbus 450

3720 AL BILTHOVEN



**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
AVD326002015358

Bijlagen

2

Datum 24 december 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 23 december 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD326002015358. 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: 32600

Naam instelling of organisatie: InTraVacc

Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde:

██████████

Straat en huisnummer: Antonie van Leeuwenhoeklaan 9

Postbus: 450

Postcode en plaats: 3720 AL BILTHOVEN

IBAN: NL69RBOSO569999014

Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Ministerie van VWS

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

████████████████████

Functie: Onderzoeksmedewerker

Afdeling:

██████████

Telefoonnummer:

██████████████

E-mailadres:

██

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 450
Postcode en plaats: 3720 AL BILTHOVEN
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

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: Bepalen veiligheid van bulkproducten voor vaccins tot en met het vaccin als eindproduct
Titel niet-technische samenvatting: Bepalen veiligheid van grondstoffen voor vaccins tot en met het vaccin als eindproduct
Naam DEC: DEC ALT
Postadres DEC: 450, 3720 MA Bilthoven [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

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: Melding Machtiging

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Bilthoven
Datum: 23 december 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

InTraVacc



Postbus 450

3720 AL BILTHOVEN



**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
AVD326002015358

Bijlagen

2

Datum 24 december 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 24 december 2015

Vervaldatum: 23 januari 2016

Factuurnummer: 15700358

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD326002015358	€ 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

PD ALT / Intravacc

[Redacted]

Postbus 450
3720 AL Bilthoven

**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
AVD326002015358

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
1

Datum 11 januari 2016
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 1 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bepalen veiligheid van bulkproducten voor vaccins tot en met het vaccin als eindproduct" met aanvraagnummer AVD326002015328. 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) In bijlage 2 onder vraag D schrijft u dat narcose wordt toegepast bij i.c. injectie. Deze zin lijkt niet van toepassing op deze bijlage. Kunt u dit bevestigen?
- 2) In bijlage 3 onder vraag B schrijft u in de laatste 2 zinnen over moederdieren. Deze zinnen lijken niet van toepassing op deze bijlage. Kunt u dit bevestigen?
- 3) In bijlagen 8 en 9 beschrijft u veiligheidsonderzoek op abnormale toxiciteit in cavia's en muizen. Uw instelling heeft reeds een vergunning voor dit veiligheidsonderzoek onder aanvraagnummer AVD32600201553. Kunt u aangeven hoe deze aanvragen in relatie tot elkaar staan?
- 4) In bijlagen 8 en 9 schrijft u onder vraag D dat "Daarnaast zal deze dierproef sequentieel worden ingezet". Wij maken hieruit op dat een studie naar abnormale toxiciteit in cavia's alleen zal worden ingezet wanneer de studie naar abnormale toxiciteit in muizen geen negatieve effecten laat zien. Kunt u dit bevestigen?

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

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.

Datum

11 januari 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD326002015358

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

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
Postbus 450
3720 AL Bilthoven
Antonie van Leeuwenhoeklaan 9
3721 MA Bilthoven
[REDACTED]
[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Bilthoven, 21 januari 2016

Betreft: Reactie op brief van 11 januari 2016 inzake aanvullende vragen project met aanvraagnummer
AVD 32600 2015 358

Geachte leden van de Centrale Commissie Dierproeven,

Hierbij onze reactie op uw brief van 11 januari 2016, gericht aan de Vergunninghouder en in cc aan de verantwoordelijk onderzoeker, waarin u verzoekt om aanvullende informatie inzake project AVD 32600 2015 358 (**LET OP: In uw brief worden 2 aanvraagnummers genoemd; in de ontvangstbevestiging van 24 december 2015 wordt nr. 358 aangegeven, dus we gaan er van uit dat dit het juiste nummer is**). De beantwoording van de nagestuurde aanvullende vraag (uw per mail van 12 januari jl.) is eveneens in deze reactie meegenomen.

De door u gestelde vragen – 5 in totaal - zijn door de onderzoeker beantwoord. Voor de antwoorden verwijzen wij naar bijgevoegde brief van [REDACTED].
De bijlagen waar uw vragen/opmerkingen betrekking op hadden, zijn gecorrigeerd en worden eveneens meegestuurd (bijlage 2,3 en 5).

Verder heeft u de vragen, genoemd in uw brief van 11 januari jl., ook per mail aan de DEC gezonden om de DEC in de gelegenheid te stellen informatie toe te voegen. Daarnaast heeft u op 12 januari jl. de DEC een specifieke vraag voorgelegd.

Voor de beantwoording van deze specifieke vraag aan de DEC verwijzen wij naar bijgevoegd antwoord van de DEC.

Naar aanleiding van de antwoorden van de onderzoeker (zie brief van [REDACTED] op de door de CCD gestelde vragen, doet de DEC nog de volgende aanvulling:

N.a.v. vraag 3 (*"In bijlagen 8 en 9 beschrijft u veiligheidsonderzoek op abnormale toxiciteit in cavia's en muizen. Uw instelling heeft reeds een vergunning voor dit veiligheidsonderzoek onder aanvraagnummer AVD32600201553. Kunt u aangeven hoe deze aanvragen in relatie tot elkaar staan?"*) en het antwoord van de onderzoeker [REDACTED]

[REDACTED] vergunning AVD32600201553 betreft een vergunning voor Intravacc, een andere instelling [REDACTED] vallende onder AVD326002015328 en AVD32600201553 zijn als zodanig niet aan elkaar gerelateerd.") merkt de DEC op dat er geen sprake is van duplicatie; het is uitgesloten dat beide organisaties dezelfde batches onderzoeken zonder dat van elkaar te weten.

Wij hopen dat al uw vragen hiermee beantwoord zijn.

Met vriendelijk groet,

[REDACTED]
[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven / CCD
Postbus 20410
2500 EK Den Haag

Datum 14 januari 2016
Betreft Aanvulling betreffende aanvraag AVD326002015328

L.S.

Bijgaand een reactie op de door de CCD gestelde vragen betreffende projectaanvraag AVD326002015328.

- 1) In bijlage 2 onder vraag D schrijft u dat narcose wordt toegepast bij i.c. injectie. Deze zin lijkt niet van toepassing op deze bijlage. Kunt u dit bevestigen?**

Dit kunnen wij bevestigen. Tijdens het splitsen van de bijlagen voor dit proefdierexperiment op advies van de DEC zijn niet alle gegevens juist verwerkt. De betreffende bijlage is hierop aangepast.

- 2) In bijlage 3 onder vraag B schrijft u in de laatste 2 zinnen over moederdieren. Deze zinnen lijken niet van toepassing op deze bijlage. Kunt u dit bevestigen?**

Idem vraag 1.

- 3) In bijlagen 8 en 9 beschrijft u veiligheidsonderzoek op abnormale toxiciteit in cavia's en muizen. Uw instelling heeft reeds een vergunning voor dit veiligheidsonderzoek onder aanvraagnummer AVD32600201553. Kunt u aangeven hoe deze aanvragen in relatie tot elkaar staan?**

Het veiligheidsonderzoek vallende onder de vergunning AVD32600201553 is niet van toepassing voor ons [REDACTED] Vergunning AVD32600201553 betreft een vergunning voor Intravacc, een andere instelling aanwezig op dezelfde locatie als [REDACTED] Veiligheidsonderzoek vallende onder AVD326002015328 en AVD32600201553 zijn als zodanig niet aan elkaar gerelateerd.

- 4) In bijlagen 8 en 9 schrijft u onder vraag D dat "Daarnaast zal deze dierproef sequentieel worden ingezet". Wij maken hieruit op dat een studie naar abnormale toxiciteit in cavia's alleen zal worden ingezet wanneer de studie naar abnormale toxiciteit in muizen geen negatieve effecten laat zien. Kunt u dit bevestigen?**

Ja, dit kunnen wij bevestigen. In het kader van verfijning en eventueel vermindering hebben wij in overleg met de IvD besloten om deze test sequentieel in te zetten.

5) In navolging van de e-mail die ik u gisteren heb gezonden, wil ik u ook nog verzoeken om, voor de volledigheid, in bijlage 5 vraag L in te vullen.

Wij verzoeken de CCD om in betreffende bijlage, onder de vraag "Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?" het vakje "ja" aan te kruisen.

Hopende met deze toelichting uw vragen naar tevredenheid te kunnen hebben beantwoord.

Met vriendelijke groet,

██████████
██



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.	32600
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Intravacc
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer 2 Type dierproef Veiligheidsonderzoek op Working Cell Banks van [REDACTED]

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 document beschrijft het veiligheidsonderzoek op vreemde agentia, conform wet- en regelgeving van de Europese Farmacopee (Ph.Eur) voor de Working Cell Bank (WCB) t.b.v. de productie van [REDACTED]. Zie Ph.Eur. paragraaf 5.2.3 Cell substrates for the production of vaccins for human use (Working Cell Bank). Voor elk nieuw geproduceerde WCB dient dit onderzoek uitgevoerd te worden. Het veiligheidsonderzoek zoals beschreven in de Ph. Eur. bestaat uit 3 aparte *in vivo* testen, namelijk een veiligheidsstest in volwassen muizen, een veiligheidsstest in muizenpups en een onderzoek op aanwezigheid van LCM in volwassen muizen. Deze *in vivo* testen worden in 3 aparte bijlages toegelicht.

In deze bijlage wordt de tweede test beschreven waarbij 10 muizenpups worden geïnjecteerd met één vaste concentratie [REDACTED]-cellen afkomstig van de WCB.

Gedurende dit experiment, welke 4 weken duurt, worden de dieren op welzijn geobserveerd en in totaal 4 keer gewogen. Als het welzijn van de dieren niet aangetast wordt (de dieren vertonen geen algehele malaise, immobiliteit of gewichtsverlies) dan wordt de WCB veilig bevonden (vrij van vreemde agentia) en kan deze worden vrijgegeven.

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.

Test nr. 2: Veiligheidsonderzoek op de [] Working Cell Bank in muizenpups.

De proef wordt uitgevoerd met 2 nesten muizenpups, deze muizenpups moeten jonger dan 24 uur zijn. In totaal zijn er 10 muizenpups nodig. Voor het verkrijgen van deze 2 nesten pups worden 2 drachtige moeders gebruikt. De moederdieren maken geen deel uit van de proef en ondergaan geen biotechnische handelingen. De moederdieren zijn nog steeds "proefdieren", maar ze worden niet meegerekend in de "dierproef". De muizenpups worden op dag 0 subcutaan ingespoten met 10^7 levensvatbare []-cellen (WCB) in een volume van 0,1 ml. Vervolgens worden de dieren 28 dagen geobserveerd op verschijnselen van algehele malaise en ongerief. Gedurende het onderzoek worden de gehele nesten wekelijks gewogen. Muizen die ziekteverschijnselen vertonen, afnemen in gewicht of zijn doodgegaan, worden pathologisch onderzocht. De dierproef is valide wanneer minimaal 80% van de dieren de test overleeft. De dierproef wordt invalide verklaard wanneer meer dan 20% van de dieren sterven tijdens de proef, mits deze dieren niet ten gevolge van vreemde agentia zijn gestorven. De WCB wordt vrij bevonden van vreemde agentia als er geen bewijs is van de aanwezigheid van vreemde agentia (d.w.z. wanneer de dieren gedurende de dierproef (28 dagen) geen ongeriefverschijnselen vertonen en vanuit pathologisch onderzoek geen bewijs is voor de aanwezigheid van vreemde agentia). De WCB wordt niet vrij gegeven als ongeriefverschijnselen of pathologisch onderzoek aantonen dat er vreemde agentia aanwezig zijn in de WCB.

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

Per test worden 10 muizenpups gebruikt (wettelijk voorgeschreven volgens EP). Een statistische analyse c.q. power analyse is niet mogelijk.

B. De dieren

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

Voor deze dierproef worden muizen gebruikt afkomstig van binnenlands /buitenlands geregistreerde fok. Voor dit veiligheidsonderzoek in muizenpups zijn 2 drachtige moeders nodig voor het verkrijgen van 10 muizenpups (2 nesten). Er is geen voorkeur voor het geslacht.

Voor het testen van één WCB zijn 10 muizenpups nodig. Voor de komende [] zijn er [] WCB producties gepland en komt het totale gebruik op [] proefdieren voor deze veiligheidstest. De moederdieren worden niet mee genomen in deze berekening. Deze dieren maken geen deel uit van het experiment, aangezien er geen handelingen op deze moederdieren worden uitgevoerd. Wel zijn zij een essentieel voor deze dierproef. Zij verzorgen de pups gedurende de vier weken dat dit experiment duurt. Zonder de moederdieren zullen de pups vroegtijdig sterven.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Veiligheidsonderzoek voor WCB middels een *in vivo* experiment wordt voorgeschreven door de Europese Farmacopee §5.2.3 en is opgenomen in het registratiedossier. Voor test nr. 2 (muizenpups) is nog geen geaccepteerd alternatief voorhanden. Dieren die duidelijke verschijnselen vertonen van ongerief, dienen voortijdig te worden geëuthanaseerd om onnodig lijden te voorkomen. Vervolgens zullen deze dieren pathologisch worden onderzocht op afwijkingen, zodat de oorzaak achterhaald kan worden. Als het te testen WCB de oorzaak is dan zal de WCB niet worden vrijgegeven voor vaccin productie.

Als verfijning voor het ongerief van de moederdieren worden alleen de pups weggehaald die worden ingespoten met de []-cellen. De overige pups blijven bij de moeder tot de ingespoten pups zijn teruggeplaatst. Bij een groepsgrootte van 5 dieren of minder, blijft er minimaal 1 pup bij de moeder liggen. Deze wordt ingespoten nadat de reeds ingespoten pups bij de moeder zijn terug geplaatst. Dit minimaliseert het ongerief dat het moederdier ondervindt. De eventueel overtollige pups zullen daarna geen deel meer uitmaken van het experiment en geëuthanaseerd worden. Daarnaast zal het veiligheidsonderzoek van de WCB deels sequentieel ingezet worden, waarbij de meest kwetsbare groep, de test met de muizenpups (deze bijlage), als eerste wordt gestart voor het testen van de WCB. Wanneer deze muizenpups na 1 week nog in leven zijn, zullen de overige onderdelen van het veiligheidsonderzoek (test nr. 1 & 3, zie hiervoor betreffende bijlage) gestart worden.

Het subcutaan injecteren + euthanaseren (CO₂ / O₂) van de dieren zijn handelingen die mogelijk fysiek ongerief veroorzaken bij de dieren. Uit historische data blijkt dat vreemde agentia niet voorkomen in de door [] geproduceerde WCB's. De kans dat de dieren ongerief zullen ondervinden als gevolg van vreemde agentia is hierdoor minimaal. Het injecteren en euthanaseren wordt door getraind en bekwaam personeel uitgevoerd. Ook dit verlaagt het ongerief en verhoogt de verfijning van deze dierproef.

Deze test wordt regulier uitgevoerd om de veiligheid te bepalen van WCB die gebruikt worden voor de productie van vaccins. Een vermindering van het aantal dieren per te testen WCB is niet mogelijk. Wet- en regelgeving schrijven voor, dat voor dit onderdeel (test nr. 2) er minimaal 10 dieren gebruikt worden om te bepalen of de WCB vrij is van vreemde agentia..

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.

Het injecteren en euthanaseren wordt door getraind en bekwaam personeel uitgevoerd. Dit verlaagt het ongerief en verhoogt de verfijning van deze dierproef.

E. Herhaling

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

Herhaling en duplicering

Wettelijk is het verplicht om van elke nieuw geproduceerde WCB de veiligheid te bepalen middels een dierproef. De WCB wordt niet vrij gegeven als ongeriefverschijnselen of pathologisch onderzoek aantonen dat er vreemde agentia aanwezig zijn in de WCB. In principe worden er geen herhalingen uitgevoerd.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

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 > Anesthesie en analgesie worden niet toegepast bij een subcutane injectie, het ongerief is voor deze handeling is laag.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting verwacht.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Indien er vreemde agentia in het vaccin aanwezig zijn kunnen de dieren als gevolg hiervan ziek worden (en dus ongerief ondervinden). Dit is echter niet waarschijnlijk op basis van historische data.

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

Nvt

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.

Voor test nr. 2 (test in muizenpups) is er sprake van licht 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.

Na injectie met de WCB [REDACTED] zijn de dieren niet meer geschikt voor andere doeleinden, aangezien de muizen geïnjecteerd zijn met biologische agentia. Dit kan invloed hebben op de resultaten wanneer deze dieren voor een andere dierproef gebruikt worden. Aan het einde van de dierproef worden alle dieren om deze reden geëuthanaseerd.

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.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 32600
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. Intravacc
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in. Volgnummer 3 Type dierproef Veiligheidsonderzoek op Working Cell Banks van [REDACTED] (Onderzoek naar LCM)

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 document beschrijft het veiligheidsonderzoek onderzoek op vreemde agentia, conform wet- en regelgeving van de Europese Farmacopee (Ph.Eur) voor de [REDACTED] Working Cell Bank (WCB) t.b.v. de productie van [REDACTED] Zie Ph.Eur. paragraaf 5.2.3 Cell substrates for the production of vaccines for human use (Working Cell Bank). Voor elk nieuw geproduceerde WCB dient dit onderzoek uitgevoerd te worden. Het veiligheidsonderzoek zoals beschreven in de Ph. Eur. bestaat uit 3 aparte *in vivo* testen; namelijk een veiligheidstest in volwassen muizen, een veiligheidstest in muizenpups en een onderzoek op aanwezigheid van LCM in volwassen muizen. Deze *in vivo* testen worden in 3 aparte bijlages toegelicht.

In deze bijlage wordt test nr. 3 beschreven waarbij 10 volwassen muizen worden geïnjecteerd met één vaste concentratie [REDACTED] afkomstig van de WCB.

In deze test wordt specifiek getest op de aanwezigheid van lymfocytische choriomeningitis (LCM)veroorzakende virussen. Gedurende dit experiment, welke 4 weken duurt, worden de dieren op welzijn geobserveerd en in totaal 4 keer gewogen. Als het welzijn van de dieren niet aangetast wordt (de dieren vertonen geen algehele malaise, immobiliteit of gewichtsverlies) dan wordt de WCB veilig bevonden (vrij van LCM veroorzakende virussen) en kan deze worden vrijgegeven.

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.

Test nr. 3: Veiligheidsonderzoek voor de Working Cell Bank op afwezigheid LCM in volwassen muizen.
De proef wordt uitgevoerd met in totaal 10 volwassen muizen (9-12 weken). Voordat de test start dienen de dieren individueel gewogen en gemerkt te worden. Op dag 0 worden de dieren intracerebraal ingespoten worden met 10^8 (WCB) in een volume van 10 µl, waarna ze 28 dagen lang geobserveerd worden op verschijnselen van algehele malaise en ongerief. Gedurende het onderzoek worden de dieren wekelijks gewogen. Wanneer de dieren na 28 dagen geen ongeriefsverschijnselen worden aangenomen dat de geteste WCB vrij is van LCM. Muizen die ziekteverschijnselen vertonen, afnemen in gewicht of zijn doodgegaan, worden pathologisch onderzocht. De dierproef wordt valide verklaard wanneer meer dan 80% van de dieren de proef overleeft. De dierproef wordt invalide verklaard wanneer meer dan 20% van de dieren sterven tijdens de proef, mits deze dieren niet ten gevolge van LCM zijn gestorven. De WCB wordt vrij bevonden van LCM als er geen bewijs is van de aanwezigheid van LCM (d.w.z. wanneer de dieren in de 28 dagen geen ongeriefsverschijnselen vertonen en vanuit pathologisch onderzoek geen bewijs is LCM). De WCB wordt niet vrij gegeven als ongeriefsverschijnselen of pathologisch onderzoek aantonen dat er LCM aanwezig is WCB.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Per test worden 10 dieren gebruikt, (wettelijk voorgeschreven volgens EP). Een statistische analyse c.q. power analyse is niet mogelijk.

B. De dieren

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

Voor deze dierproef worden muizen gebruikt afkomstig van binnenlands /buitenlands geregistreerde fok. Het betreft voor deze test muizen met een leeftijdsrange van 9-12 weken bij aanvang van de test. Er is voor deze test geen voorkeur voor het geslacht van de dieren zolang de dieren maar van 1 geslacht zijn bij het starten van de test. Voor het testen van één WCB zijn 10 dieren nodig. Voor de komende [redacted] zijn er [redacted] WCB producties gepland en komt het totale gebruik op [redacted] proefdieren voor deze veiligheidstest.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Veiligheidsonderzoek voor WCB middels een *in vivo* experiment wordt voorgeschreven door de Europese Farmacopee §5.2.3 en is opgenomen in het registratiedossier.

Voor test nr. 3 (onderzoek op LCM) is nog geen geaccepteerd alternatief voorhanden. Daar waar het gaat om het testen op specifieke virussen is het overstappen naar *in vitro* testen (bijv. PCR) een mogelijkheid, mits er een gevalideerde methode voorhanden is met geschikte gevoeligheid en gegarandeerde specificiteit, welke erkend wordt door registratieautoriteiten. Echter omdat een LCM test m.b.v. PCR afwijkt van de Ph.Eur zal validatieonderzoek nodig zijn. Voert deze test sporadisch uit, maximaal 1 maal. Het opzetten van een gedegen validatieonderzoek voor het ontwikkelen van een *in vitro* alternatief, zoals bovengenoemde PCR, zonder dat hiermee extra dierproeven nodig zijn is onmogelijk. Wel zal in gesprek blijven met overige betrokken onderzoeksinstanties en het EDQM om op de hoogte te blijven omtrent de ontwikkelingen van alternatieven voor het aantonen van vreemde virussen in cell banks. Daarnaast is gewenst dat een dergelijk alternatief gevalideerd wordt op Europees niveau. zal zich hiervoor wel open stellen en deelnemen aan bijvoorbeeld de hiervoor benodigde ringstudies. Op het gebied van verfijning worden de volgende maatregelen toegepast: Voor de huisvesting wordt er kooiverrijking toegepast gedurende de hele dierproef (4 weken). Daarnaast zal het veiligheidsonderzoek van de WCB deels sequentieel ingezet worden, waarbij de meest kwetsbare groep, de test met de muizenpups (test nr. 2), als eerste wordt gestart voor het testen van de WCB. Wanneer deze muizenpups na 1 week nog in leven zijn, zullen de overige onderdelen van het veiligheidsonderzoek (test nr. 1 & 3) gestart worden.

Het intracerebraal injecteren + euthanaseren (CO_2 / O_2) van de dieren zijn handelingen die mogelijk fysiek ongerief veroorzaken bij de dieren. Uit historische data blijkt dat vreemde agentia niet voor te komen in de door geproduceerde WCB's. De kans dat de dieren ongerief zullen ondervinden als gevolg van vreemde agentia is hierdoor minimaal. Het injecteren en euthanaseren wordt door getraind en bekwaam personeel uitgevoerd. Ook dit verlaagt het ongerief en verhoogt de verfijning van deze dierproef. Daarnaast wordt er narcose wordt toegepast bij de intracerebrale injectie (om het ongerief te verlagen).

Deze test wordt regulier uitgevoerd om de veiligheid te bepalen van WCB die gebruikt worden voor de productie van vaccins. Een vermindering van het aantal dieren per te testen WCB is niet mogelijk. Wet- en regelgeving schrijven voor, dat voor dit onderdeel (test nr. 3) er minimaal 10 dieren gebruikt worden om te bepalen of de WCB vrij is van LCM. Een vermindering van dit aantal dieren zal leiden tot invalide testen en dus herhaling van de dierproef.

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.

Het injecteren en euthanaseren wordt door getraind en bekwaam personeel uitgevoerd. Dit verlaagt het ongerief en verhoogt de verfijning van deze dierproef. Tevens wordt narcose toegepast bij i.c. injectie om het ongerief te verlagen.

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.

Wettelijk is het verplicht om van elke nieuw geproduceerde WCB de veiligheid te bepalen middels een dierproef. De WCB wordt niet vrij gegeven als ongeriefverschijnselen of pathologisch onderzoek aantonen dat er vreemde agentia aanwezig zijn in de WCB. In principe worden er geen herhalingen uitgevoerd.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

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 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.c. toediening onder narcose i.v.m. optreden pijn.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?
Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting verwacht.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Indien er vreemde agentia in het vaccin aanwezig zijn kunnen de dieren als gevolg hiervan ziek worden (en dus ongerief ondervinden). Dit is echter niet waarschijnlijk op basis van historische data.

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

Nvt

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.

Voor test nr. 3 (test in volwassen muizen, onderzoek naar LCM) is er sprake van 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.

Na injectie met de WCB [redacted] zijn de dieren niet meer geschikt voor andere doeleinden, aangezien de muizen geïnjecteerd zijn met biologische agentia. Dit kan invloed hebben op de resultaten wanneer deze dieren voor een andere dierproef gebruikt worden. Aan het einde van de dierproef worden alle dieren om deze reden geëuthanaseerd.

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.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 32600

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. Intravacc

1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in. 5

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

Veiligheidsonderzoek op [redacted] en [redacted]

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Dit document beschrijft de veiligheidsonderzoeken van het [redacted] en het [redacted] conform wet- en regelgeving van de Europese Farmacopee (Ph.Eur), zie Ph.Eur. [redacted] (Dit document beschrijft veiligheidsstesten betreffende het [redacted] vaccin). [redacted] produceert zowel [redacted] als halffabriicaat (tussen product) en het [redacted] (eind product). Tevens heeft [redacted] klanten die het [redacted] als product afnemen bijv. voor het formuleren van veterinaire vaccins. Om deze reden moeten beide producten gecontroleerd en vrijgegeven worden betreffende hun veiligheid (afwezigheid van [redacted])

Test 1 en 2 betreffen testen die worden uitgevoerd op het [redacted] test 3 betreft een test welke uitgevoerd wordt op het [redacted] vaccin als eindproduct. Hiervoor worden 3 verschillende dierexperimenten gebruikt.

Test 1: Veiligheidsbepaling van het [redacted]

In deze test wordt onderzocht of het onschadelijke [redacted] geheel [redacted] is en dus vrij is van het [redacted]. In deze test worden dieren geïnjecteerd met 1ml van één vaste concentratie van het [redacted]. Gedurende 3 weken worden alle dieren geobserveerd op welzijn. Tevens worden de dieren wekelijks gewogen (gewichtstoe- of afname is een meetbare parameter van het welzijn van de dieren). Aan het einde van de dierproef worden de dieren geëuthanaseerd. Als de dieren gedurende de hele proef geen [redacted] ziekteverschijnselen vertonen, er geen gewichtsverlies geconstateerd wordt en er geen dieren sterven voldoet het [redacted] aan de veiligheidseisen en kan het worden vrijgegeven voor het formuleren van het [redacted] zowel voor humaan als veterinair gebruik.

Test 2: Veiligheidsbepaling [redacted]

In deze test wordt onderzocht [redacted]

[redacted] voor een periode van 6 weken. Na deze zes weken worden 2 groepen dieren (controle en test groep) geïnjecteerd met [redacted] van het te testen [redacted]. Gedurende dit experiment worden de dieren op welzijn geobserveerd en worden ze wekelijks gewogen (gewichtstoe- of afname is een meetbare parameter van het welzijn van de dieren). Aan het einde van de dierproef worden de dieren geëuthanaseerd. Als de dieren gedurende de hele proef geen [redacted] ziekteverschijnselen vertonen, er geen gewichtsverlies geconstateerd wordt en er geen dieren sterven voldoet het [redacted] aan de veiligheidseisen en kan het worden vrijgegeven voor het formuleren van het [redacted] zowel voor humaan als veterinair gebruik.

Test 3: Veiligheidsbepaling van [redacted]

In deze test wordt onderzocht of het [redacted] vrij is van het [redacted]. Het [redacted] vaccin is geformuleerd vanuit het [redacted]

[redacted] De matrix van het [redacted] is compleet anders dan dat van het [redacted]

[redacted] Deze veranderingen kunnen van invloed zijn op de veiligheid van het [redacted]

[redacted] De dieren worden geïnjecteerd met 1 concentratie van het te testen [redacted] vaccin [redacted]. Gedurende dit experiment worden de dieren op welzijn geobserveerd en worden ze wekelijks gewogen (gewichtstoe- of afname is een meetbare parameter van het welzijn van de dieren). Als de dieren gedurende de hele proef geen [redacted] ziekteverschijnselen vertonen, er geen gewichtsverlies geconstateerd wordt en er geen dieren sterven voldoet het [redacted] vaccin aan de veiligheidseisen en kan het worden vrijgegeven voor humaan gebruik.

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.

Test 1: Veiligheidsbepaling van het [redacted]

Op de dag van aankomst worden de dieren gewogen en gemerkt (d.m.v. kleuring). Daarna krijgen de dieren minimaal 1 week te tijd om te acclimatiseren. De test bestaat uit één groep van 5 vrouwelijke cavia's. Het startgewicht van de cavia's ligt tussen de 250-350 gram. Op dag 0 (start van experiment) worden de dieren individueel subcutaan geïnjecteerd met [redacted] van het te testen [redacted]. Gedurende

3 weken worden alle dieren geobserveerd op verschijnselen van algehele malaise en ongerief. Tevens worden de dieren wekelijks gewogen. Aan het einde van de dierproef worden de dieren geëuthanaseerd (KR gevolgd door Pentobarbital). Als de dieren gedurende de hele proef geen ziekteverschijnselen vertonen, er geen gewichtsverlies geconstateerd wordt en er geen dieren sterven voldoet het [redacted] aan de veiligheidsisen en kan het worden vrijgegeven voor het [redacted] vaccin, zowel voor humaan als veterinair gebruik.

Test 2: Veiligheidsbepaling

In deze test wordt het [redacted] opgesplitst in 2 samples (controle sample en test sample) met elk hun eigen voorbehandeling. De *in vivo* test bestaat uit twee groepen van elk 5 vrouwelijke cavia's. Op de dag van aankomst worden de dieren gewogen en gemerkt (d.m.v. kleuring). Daarna krijgen de dieren minimaal 1 week te tijd om te acclimatiseren. Het start gewicht van de cavia's ligt tussen de 250-350 gram. Op dag 0 van de dierproef wordt groep 1 individueel subcutaan geïnjecteerd met [redacted] van het controle sample en de test groep individueel subcutaan geïmmuniseerd met [redacted] van het test sample, zoals voorgeschreven in de Ph.Eur.

Gedurende 3 weken worden alle dieren geobserveerd op verschijnselen van algehele malaise en ongerief. Tevens worden de dieren wekelijks gewogen. Aan het einde van de dierproef worden de dieren geëuthanaseerd (KR gevolgd door Pentobarbital). Als de dieren gedurende de hele proef geen gerelateerde ziekteverschijnselen vertonen, er geen gewichtsverlies geconstateerd wordt en er geen dieren sterven voldoet het [redacted] aan de veiligheidsisen en kan het worden vrijgegeven voor het [redacted] vaccin, zowel voor humaan als veterinair gebruik

Test 3: Veiligheidsbepaling

Op de dag van aankomst worden de dieren gewogen en gemerkt (d.m.v. kleuring). Daarna krijgen de dieren minimaal 1 week te tijd om te acclimatiseren. De test bestaat uit één groep van 5 vrouwelijke cavia's. Het startgewicht van de cavia's ligt tussen de 250-350 gram. Op dag 0 worden de dieren individueel subcutaan geïnjecteerd met [redacted] de humane dosis van het te testen vaccin. Gedurende 3 weken worden alle dieren geobserveerd op verschijnselen van algehele malaise en ongerief. Tevens worden de dieren wekelijks gewogen. Aan het einde van de dierproef worden de dieren geëuthanaseerd (KR gevolgd door Pentobarbital). Als de dieren gedurende de hele proef geen [redacted] ziekteverschijnselen vertonen, er geen gewichtsverlies geconstateerd wordt en er geen dieren sterven voldoet het [redacted] aan de veiligheidsisen en kan het worden vrijgegeven voor humaan gebruik.

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

Deze bijlage beschrijft 3 testen. Per te testen sample zijn er voor **test 1** vijf cavia's, voor **test 2** tien cavia's en voor **test 3** vijf cavia's nodig. Deze aantallen worden wettelijk voorgeschreven volgens de Ph. Eur. Een statistische analyse c.q. power analyse is niet mogelijk.

B. De dieren

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

Voor deze dierproeven worden cavia's gebruikt afkomstig van binnenlands /buitenlands geregistreerde fok. Het betreft cavia's van 1 sexe die tussen de 250-350 gram wegen bij aanvang van de drie testen..

Per te testen [redacted]

Dit brengt het totaal gebruik aan proefdieren op [redacted]

Er worden circa [redacted] testen ingezet binnen een periode van [redacted]

Per te testen [redacted] zijn [redacted] dieren nodig (**test 3**). [redacted] voor een periode van [redacted] komt dit neer op [redacted] dieren brengt het totaal gebruik aan proefdieren op [redacted]

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

- Nee, ga door met vraag D.
 Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

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

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Veiligheidsonderzoeken [redacted] deel aan een ringstudy om een *in vitro* alternatief te ontwikkelen [redacted] Er is nog geen geaccepteerd alternatief voorhanden. Momenteel neemt [redacted] Er wordt niet verwacht dat er binnen 5 jaar een volwaardig alternatief goedgekeurd is door EDQM. Mocht dit wel het geval zijn, zullen wij kijken naar de mogelijkheden om deze te implementeren.

Het veiligheidsonderzoek voor [redacted] middels een *in vivo* experiment wordt voorgeschreven door de [redacted] Er is nog geen geaccepteerd alternatief voor handen. Het is nog onduidelijk of het hierboven beschreven alternatief ook toepasbaar is op [redacted] vaccins.

Het verminderen van het aantal dieren per dier test is voor alle dier testen niet mogelijk. De aantallen worden per diertest voor geschreven door de Ph.Eur. Hiervan afwijken, leidt tot invalide testen. De producten [redacted] kunnen dan onmogelijk worden vrijgegeven voor vaccin productie of vaccin gebruik (zowel humane als veterinaire doeleinden).

Op het gebied van verfijning wordt al het mogelijke gedaan. Bij alle drie de testen wordt gedurende de hele dierproef (3 weken) kooiverrijking toegepast. Het subcutaan injecteren vindt vanwege het volume plaats in de nek en het euthanaseren van de dieren zijn handelingen die fysiek ongerief veroorzaken bij de

dieren. Dit injecteren en euthanaseren wordt door getraind en bekwaam personeel uitgevoerd. Dit beperkt het ongerief dat de dieren ondervinden.

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.

Deze testen wordt regulier uitgevoerd voor het veilig verklaren van [redacted]. Dit leidt tot vrijgifte van [redacted] voor vaccin productie en vrijgifte [redacted]. Het subcutaan injecteren en het euthanaseren van de dieren zijn handelingen welke mogelijk fysiek ongerief kunnen veroorzaken bij de dieren. Dit injecteren en euthanaseren wordt door getraind en bekwaam personeel uitgevoerd. Op deze manier worden pijn, lijden of angst tot een minimum beperkt.

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.

Wettelijk is het verplicht om van elk nieuw geproduceerde [redacted] vaccin de veiligheid te bepalen middels deze dierproeven. Daarnaast worden op [redacted] vaccins als eindproduct ook stabiliteitsstudies uitgevoerd. Een goedgekeurd en vrijgegeven [redacted] heeft niet opnieuw getest te worden. Wanneer meer dan 1 cavia sterft tijdens de observatieperiode voor test 1, 2 of 3, door een a-specifieke oorzaak mag de test eenmalig herhaald worden. Wanneer tijdens deze herhaling meer dan 1 dier sterft, zal [redacted] vaccin afgekeurd worden.

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.

Já

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting verwacht.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Nvt

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

Nvt

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 ongeriefclassificatie voor alle dierproeven is 'licht'. Het subcutaan injecteren veroorzaakt ongerief bij de dieren. De euthanasie methode wordt uitgevoerd onder anesthesie (Ketamine + Xylazine gevolgt door Pentobarbital). Dit veroorzaakt licht ongerief. Er bestaat een kleine kans dat er [redacted] aanwezig zijn in het [redacted] als dit het geval is zullen de dieren ziek worden en valt de ongeriefclassificatie hoger uit. Het is zeer onwaarschijnlijk dat dit gebeurt, dit is namelijk nog niet eerder voorgekomen in voorgaande testen.

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.

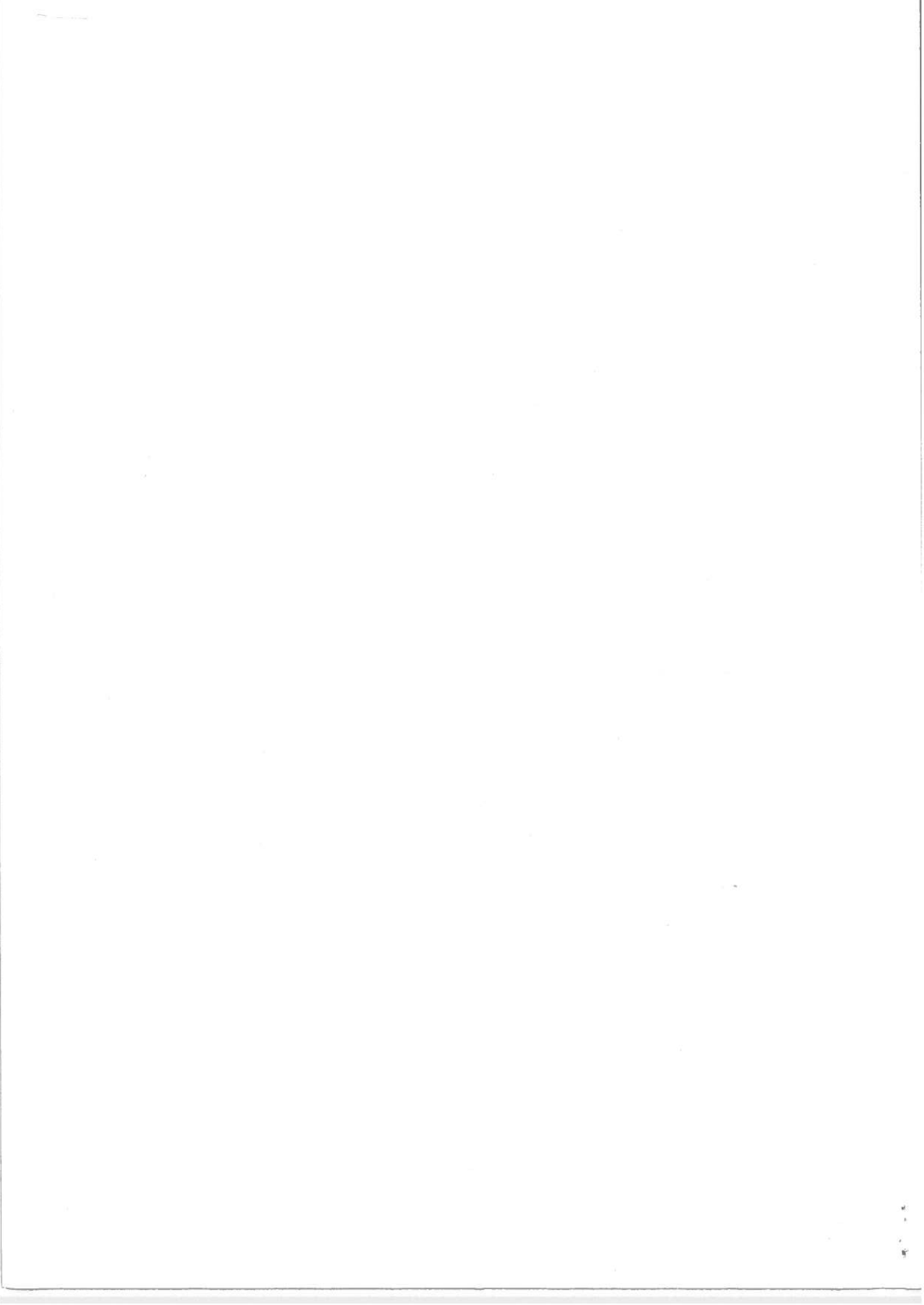
- Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Na immunisatie met [redacted] zijn de dieren niet meer geschikt voor andere doeleinden. Om deze reden worden alle dieren aan het einde van de dierproef geëuthanaseerd.

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



Beste leden van de CCD,

In uw brief aan [REDACTED] PD Alt/Intravacc, in kopie aan de onderzoeker gericht, vraagt u om een reactie op de door u voorgenomen voorwaarde bij projectaanvraag AVD 32600 2015 358, nl. het alternerend gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren.

De onderzoeker heeft in een concept-reactie aan de IvD hierop aangegeven, dat er geen dringende redenen zijn om niet aan dit verzoek tegemoet te komen.

In u bovengenoemde brief heeft u eveneens verzocht om een aanvullend advies van de DEC inzake de door u voorgenomen voorwaarde. Als reden voor uw voorgenomen voorwaarde geeft u aan dat u er naar streeft om het aantal in voorraad gedode dieren te minimaliseren.

Naar aanleiding van u verzoek heeft de IvD contact gehad met de leverancier van de dieren. De leverancier heeft laten weten dat zij op basis van de vraag tot een bepaalde fok-strategie komen. Dit houdt in dat voor sommige soorten, een groot deel van de vrouwelijke dieren in een vroeg stadium (voor speenleeftijd) worden geëuthanaseerd, voor andere soorten gebeurt dit met de mannelijke dieren. Van sommige soorten worden ongeveer evenveel vrouwelijke als mannelijke dieren afgenomen (en worden er dus geen dieren in een vroeg stadium geëuthanaseerd).

De DEC is dan ook van mening dat de voorgenomen voorwaarde om evenveel mannelijke als vrouwelijke dieren te gebruiken, niet per definitie leidt tot het terugdringen van het aantal in voorraad gedode dieren. Dit is diersoortafhankelijk. Voor sommige diersoorten kan juist het gebruik van één geslacht een optimale besparing opleveren.

De DEC stelt voor dat de onderzoeker samen met de IvD contact opneemt met de leverancier, om een zo optimaal mogelijke strategie uit te zetten, waardoor het aantal in voorraad gedode dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. De IvD kan hier toezicht op houden.

De onderzoeker, de IvD en de DEC onderschrijven allen dit voorstel.

Graag zien wij uw reactie tegemoet.

Met vriendelijke groet,

DEC Alt



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

InTraVacc

Postbus 450
3720 AL Bilthoven

**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
AVD326002015358

Uw referentie

25 FEB. 2016

Datum

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen

1

Geachte [REDACTED]

Op 23 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bepalen veiligheid van bulkproducten voor vaccins tot en met het vaccin als eindproduct" met aanvraagnummer AVD326002015358. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 21 januari 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld na vragen van de CCD, u heeft de bijlagen dierproeven 3.4.4.2, 3.4.4.3 en 3.4.4.5 aangepast naar aanleiding van de vragen. Een vraag betrof een mogelijke overlap tussen deze projectaanvraag en AVD32600201553 voor wat betreft het veiligheidsonderzoek naar abnormale toxiciteit. In uw antwoord geeft u aan dat beide aanvragen geen relatie tot elkaar hebben omdat het aanvragen door twee verschillende bedrijven betreft, namelijk InTraVacc en [REDACTED]. Echter, beide aanvragen worden door de instellingsvergunninghouder van InTraVacc onder nummer 32600 ingediend en derhalve kan dit niet anders gezien worden dan een risico op herhaling van het veiligheidsonderzoek naar abnormale toxiciteit.

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 eerste twee voorwaarden zijn project specifieke voorwaarden. De voorwaarde betreffende gebruik van beide geslachten is gesteld om het aantal dieren in voorraad gedood zo klein mogelijk te houden. U heeft aangegeven in uw aanvraag dieren van beide geslachten in te kunnen zetten. De tweede project specifieke voorwaarde betreft de mogelijke overlap van projecten binnen de instelling. De algemene voorwaarde wordt gesteld aan meerjarige projecten om te voldoen aan datgene wat voortvloeit uit artikel 10a van de wet.

U kunt met uw project "Bepalen veiligheid van bulkproducten voor vaccins tot en met het vaccin als eindproduct" starten. De vergunning wordt afgegeven van 25 februari 2016 tot en met 1 januari 2021. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC ALT gevoegd. Dit advies is opgesteld op 30 november 2015. Op 12 januari 2016 hebben wij u een vraag gesteld over de ongeriefclassificatie. Deze vraag heeft u op 22 januari 2016 beantwoord. Op 2 februari 2016 hebben wij u om aanvullend advies gevraagd vanwege het stellen van een specifieke voorwaarde aan de vergunning. U heeft op 10 februari 2016 aanvullend advies gegeven. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij kunnen ons grotendeels vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie grotendeels over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering maar stellen aanvullend de voorwaarde betreffende het evenredig inzetten van beide geslachten.

Op 2 februari 2016 is het voornemen om aan dit project specifieke voorwaarde te verbinden aan u voorgelegd omdat deze specifieke voorwaarde mogelijk de uitvoering van uw project beïnvloed. Deze voorwaarde betreft het alternerend inzetten van beide geslachten dieren in de bijlagen 3.4.4.1, 3.4.4.3, 3.4.4.5, 3.4.4.7, 3.4.4.8 en 3.4.4.9; zodat aan het einde van de looptijd van het project de geslachtsverhouding op 50/50 uitkomt.

Wij zien na de aanvullende correspondentie met de DEC en IvD geen aanleiding om de voorwaarde te herzien. U heeft in een reactie aan de Instantie voor Dierenwelzijn aangegeven dat er geen dringende redenen zijn om niet aan deze voorwaarde te kunnen voldoen.

In het aanvullend advies van de DEC wordt voorgesteld dat de onderzoeker samen met de IvD contact opneemt met de leverancier, om een zo optimaal mogelijke strategie uit te zetten, waardoor het aantal in voorraad gedode dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Dit is niet mogelijk omdat dit een deel van de verantwoordelijkheden tot besluitvorming over geslachten bij de IvD neerlegt. Het is niet mogelijk om de IvD of DEC te mandateren met een dergelijke besluitvorming.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

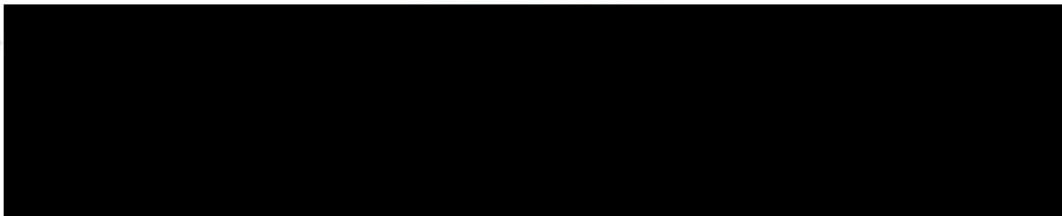
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel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

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

Meer informatie

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

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Algemeen Secretaris

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

Bijlagen

- Vergunning

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: InTraVacc
Adres: Postbus 450
Postcode en woonplaats: 3720 AL Bilthoven
Deelnemersnummer: 32600

deze projectvergunning voor het tijdvak 24 februari 2016 tot en met 1 januari 2021, voor het project "Bepalen veiligheid van bulkproducten voor vaccins tot en met het vaccin als eindproduct" met aanvraagnummer AVD326002015358, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC ALT. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoek medewerker. 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 bij digitale indiening op 21 januari 2016;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 23 december 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 30 november 2015, ontvangen op 1 december 2015; aanvullend advies ontvangen op 10 februari 2016;
 - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 21 januari 2016.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Opmerking
Veiligheidsonderzoek op Working Cell Banks van [REDACTED] (volwassen muizen)	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / wildtype	[REDACTED]	Licht	
Veiligheidsonderzoek op Working Cell Banks van [REDACTED] (zuigeling muizen)	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / wild type	[REDACTED]	Licht	+ per proef 2 moederdieren die geen uitmaken van het experiment
Veiligheidsonderzoek op Working Cell Banks van [REDACTED] (Onderzoek naar LCM)	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / wild type	[REDACTED]	Licht	
Veiligheidsonderzoek op de Working Seedlot van [REDACTED] en het [REDACTED] vaccin (Final Lot)	Cavia's (<i>Cavia porcellus</i>) / wild type	[REDACTED]	Matig	Alleen vrouwen ivm vechten
Veiligheidsonderzoek op [REDACTED] (halffabricaat) en [REDACTED] vaccin d.m.v. van 3 Verschillende dierexperimenten	Cavia's (<i>Cavia porcellus</i>) / wild type	[REDACTED]	Licht	
Veiligheidsonderzoek op [REDACTED] vaccins [REDACTED] combinatievaccin)	Cavia's (<i>Cavia porcellus</i>) / wild type	[REDACTED]	Licht	Alleen vrouwen ivm vechten
Veiligheidsonderzoek op [REDACTED] (bevattende) vaccins (Mouse Weight Gain Test)	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / wild type	[REDACTED]	Licht	
Veiligheidsonderzoek op abnormale toxiciteit; experiment in muizen (bij nieuw ontwikkeld vaccin of afwijking in het productieproces)	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / wild type	[REDACTED]	Licht	

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Opmerking
Veiligheidsonderzoek op abnormale toxiciteit; cavia experiment. (bij nieuw ontwikkeld vaccin of afwijking in het productieproces)	Cavia's (Cavia porcellus) / wild type	█	Licht	

Voorwaarden

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

In de proeven zoals beschreven in bijlagen 3.4.4.1, 3.4.4.3, 3.4.4.5, 3.4.4.7, 3.4.4.8 en 3.4.4.9 zullen zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt worden, zodat aan het einde van de looptijd van het project de geslachtsverhouding op 50/50 uitkomt.

Conform de taak van de IvD zoals beschreven in artikel 14c van de wet, ziet de IvD erop toe dat er geen onnodige herhaling van onderzoek plaatsvindt.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.

Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning.

Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn.

In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade

Datum

25 februari 2016

Onze referentieAanvraagnummer
AVD326002015358

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

[Redacted]

Van: [Redacted]
Verzonden: woensdag 2 maart 2016 12:19
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: Fw: Beschikking AVD326002015358. Eén test vergeten in vergunning op te nemen?
Bijlagen: DECadvies.pdf; Beschikking AVD326002015358.pdf

Categorieën: [Redacted]

Beste leden CCD,

Dank voor het toesturen van de beschikking voor project AVD 32600 2015 358.

Graag vragen wij uw aandacht voor het volgende.

Wij denken dat er een vergissing is gemaakt bij de opsomming van het toegekend aantal dieren per dierproef in de vergunning.

Voor "Veiligheidsonderzoek op Workingseedlot van [Redacted] en het [Redacted] vaccin (final lot) zijn [Redacted] dieren toegekend en [Redacted] gevraagd. Het lijkt er op dat alleen de dieren voor het testen van Final Seedlot zijn toegekend [Redacted]

[Redacted] en dat de dieren voor de testen van de Working Seedlot niet mee genomen zijn [Redacted]. De testen voor deze onderzoeken staan beschreven in bijlage 4.

Wij nemen aan dat het om een vergissing gaat en zien een nieuwe vergunning graag tegemoet.

[Redacted]

[Redacted]

Postbus 450
3720 AL Bilthoven
Antonie van Leeuwenhoeklaan 9
3721 MA Bilthoven

[Redacted]

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

De inhoud van dit bericht is alleen bestemd voor de geadresseerde en kan vertrouwelijke of persoonlijke informatie bevatten. Als u dit bericht onbedoeld heeft ontvangen verzoeken wij u het te vernietigen en de afzender te informeren. Het is niet toegestaan om een bericht dat niet voor u bestemd is te vermenigvuldigen dan wel te verspreiden. Aan dit bericht inclusief de bijlagen kunnen geen rechten ontleend worden, tenzij schriftelijk anders wordt overeengekomen. PD-ALT aanvaardt geen enkele aansprakelijkheid voor schade en/of kosten die voortvloeien uit onvolledige en/of foutieve informatie in e-mailberichten.

This message is intended for the exclusive use of the person(s) mentioned as recipient(s) and may contain personal and/or confidential information. If you have received this message in error, please notify the sender and delete this message from your system immediately. Directly or indirectly copying, disclosing, distributing, printing, publicising and/or in any way using this message or any part thereof by any means is strictly prohibited if you are not the intended recipient(s). This message and any associated attachments cannot be deemed as legally binding under any circumstances without the express written consent from PD-ALT. PD-ALT is not responsible for any loss and/or damages arising from any errors and/or omissions in its e-mail messages.





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Intravacc

Postbus 450
3720 AL Bilthoven

**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
AVD326002015358 herzien

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
-

17 MRT 2016

Datum

Betreft Herziening vergunning Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer [REDACTED]

Op 25 februari 2016 hebben wij u ons besluit (Onze referentie: Aanvraagnummer AVD326002015358) toegezonden, waarin is besloten uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven voor het project "Bepalen veiligheid van bulkproducten voor vaccins tot en met het vaccin als eindproduct" te vergunnen. Op 2 maart 2016 heeft uw IvD ons per e-mail gewezen op een afwijking van het aantal dieren in de vergunning van het aantal aangevraagde dieren betreffende de appendix met volgnummer 4 (Veiligheidsonderzoek op de Working Seedlot van [REDACTED] en het [REDACTED] vaccin (Final Lot)). In de appendix met volgnummer 4 is een aantal van 1670 cavia's beschreven. In de beschikking van 25 februari 2016 is per vergissing een aantal van 1620 cavia's opgenomen.

Het betreft hier een kennelijke administratieve vergissing. De aan u verstuurde vergunning bevat dus een kennelijke verschrijving en kan gecorrigeerd worden van 1620 naar 1670 cavia's in appendix 4. Voor het overige blijft het besluit van 25 februari 2016 ongewijzigd. Deze brief dient u bij uw vergunning te voegen.

Bezwaar

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

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

Datum

17 maart 2016

Onze referentie

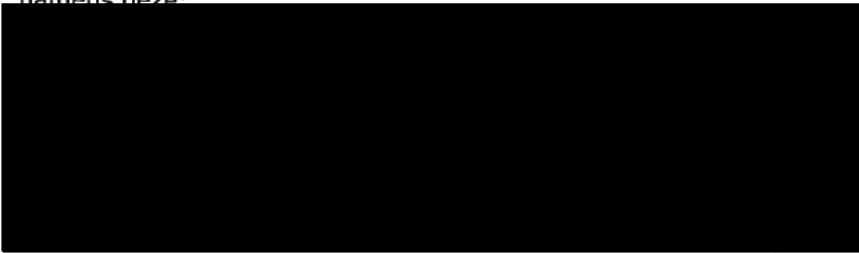
Aanvraagnummer

AVD326002015358 herzien

Meer informatie

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

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



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

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
	NTS2015359								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x			x		x	x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x		x	x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x		x	x	
8	DEC-advies				x		x	x	
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
10	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
11	Reactie verzoek aanvulling 1			x					
12	Reactie verzoek aanvulling 2				x		x	x	
13	Advies CCD		x						x
14	Beschikking en vergunning				x		x	x	
15	Mail beschikking 2-2-2016				x		x	x	
16	Mail terugkoppeling DEC 2-2-2016				x		x	x	



30 DEC 2015

AVD 105002015 35g

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

<p>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></p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10500 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen</p>
<p>1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.</p>	<p>Naam instelling of organisatie Rijksuniversiteit Groningen Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [Redacted] KvK-nummer 1179037</p>
<p>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></p>	<p>Straat en huisnummer A. Deusinglaan 1 [Redacted] Postbus [Redacted] Postcode en plaats 9713 AV GRONINGEN IBAN NL45ABNA0474567206 Tenaamstelling van het rekeningnummer Rijksuniversiteit Groningen</p>
<p>1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.</p>	<p>(Titel) Naam en voorletters [Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. Functie [Redacted] Afdeling [Redacted] Telefoonnummer [Redacted] E-mailadres [Redacted]</p>
<p>1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.</p>	<p>(Titel) Naam en voorletters [Redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. Functie [Redacted] Afdeling [Redacted] Telefoonnummer [Redacted] E-mailadres [Redacted]</p>

- 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 - 11 - 2015
- Einddatum 1 - 11 - 2020
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Comparative studies on the regulation of sleep and consequences of sleep loss
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Vergelijkende studies aan de regulatie van slaap en gevolgen van slaapttekort
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC XXXXXXXXXX
- Postadres A. Deusinglaan 1 XXXXXXXXXX
- E-mailadres secrdec.umcg@umcg.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.*

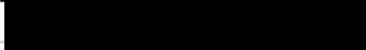
5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
-

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 GRONINGEN

Datum 27-12-2015

Handtekening 

1. **Introduction**

The first part of the report discusses the background and objectives of the study. It also outlines the methodology used for data collection and analysis.

The second part of the report presents the results of the study, including the findings from the data analysis.

The third part of the report discusses the implications of the findings and provides recommendations for future research.

The final part of the report concludes the study and summarizes the key findings. It also includes a list of references and an appendix with additional data.

2. **Methodology**

The methodology section describes the research design, data collection methods, and the statistical techniques used for data analysis. It also includes a discussion of the limitations of the study.

The methodology section also includes a description of the sample and the data collection process.

3. **Results**

The results section presents the findings of the study, including the mean values, standard deviations, and the results of the statistical tests. It also includes a discussion of the implications of the findings.

The results section also includes a discussion of the limitations of the study and the implications of the findings.

The results section also includes a discussion of the implications of the findings and provides recommendations for future research.

The final part of the report concludes the study and summarizes the key findings. It also includes a list of references and an appendix with additional data.

The final part of the report concludes the study and summarizes the key findings. It also includes a list of references and an appendix with additional data.



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.

Individuals of many species, including humans, spend a large part of their lives sleeping. It is widely accepted that sleep is homeostatically regulated and that a need for sleep builds up during wakefulness. Yet, despite many theories, the exact function of sleep remains an enigma. Moreover, sleep itself is a complex phenomenon consisting of two distinct stages, non-rapid-eye-movement (NREM) sleep or slow-wave sleep and rapid-eye-movement (REM) sleep or paradoxical sleep. Each of these two stages may have its own function in, e.g., neuronal recovery, maintenance and plasticity.

The basic characteristics of sleep regulation and the principle of sleep homeostasis have been studied in a variety of mammalian and non-mammalian species. Indeed, there is no doubt that much can be learned about the regulatory mechanisms and possible functions of sleep from comparative studies of different species. However, much of what is currently being discovered about sleep at the neurobiological and molecular levels is primarily based on experimentation in nocturnal laboratory rodents, particularly rats and mice. While rats and mice are comparable with respect to the most important aspects of sleep regulation and sleep homeostasis, they may not necessarily be comparable to all other animals. Although it is generally assumed that nocturnal rodents are a good model to learn about general principles of sleep regulation and sleep function, this assumption is hardly ever tested. Few other species are studied in much detail, perhaps because they are not easily available, are difficult to keep under laboratory conditions, or have other limitations in terms of molecular studies. In this project, we aim to study a number of specific non-rodent and/or non-mammalian species to address questions on the regulation and function of sleep and the consequences of sleep loss. These studies are important to, A) confirm findings achieved in rats and mice, thereby providing important supports for the generalizability of these findings; or B) shed new light on certain aspects of sleep regulation and sleep homeostasis that may indicate caution is required with extrapolation from studies in nocturnal rodents. The species that we have selected are one day-active mammalian species (tree shrew) and two bird species (European starling and jackdaw). The reasons for selecting these specific species are described hereafter.

The tree shrew, *Tupaia belangeri*, is a truly interesting and potentially important model for sleep and circadian research. This small omnivorous mammal originating from Southeast Asia is day-active and therefore more similar to humans than the commonly used laboratory species such as rats and mice. This may be particularly relevant in the context of sleep studies. Moreover, the tree shrew can be bred and maintained quite well in a laboratory setting and has proven to be a useful model species for experimental research (Fuchs and Corbach-Sohle, UFAW Handbook 2010). Importantly, in our first EEG study on the tree shrew, we assessed basic sleep-wake patterns and found that, while this species shares many of the basic characteristics of sleep with other mammals, it also has a number of unique sleep features that warrant further study (Coolen et al., Sleep 2012). The tree shrews had a very high amount of overall sleep (over two-thirds of the 24h day), including a substantial amount of day-time NREM sleep without ever entering REM sleep. Moreover, although the animals had a normal amount of night-time REM sleep, they did not show a clear REM sleep rebound after sleep deprivation, which provides fuel for the ongoing debate concerning the homeostic regulation of this particular sleep state (Franken, J Sleep Res 2002; Benington, J Sleep Res 2002).

In general, birds have many features of sleep in common with mammals, including the occurrence of NREM and REM sleep (Siegel, Trends in Neurosci 2008). Moreover, various studies in birds have shown sleep-dependent learning and memory processes, in particular in relation to song learning (Brawn et al., J Neurosci 2010; Shank and Margoliash, Nature 2009). This suggests that sleep plays an important role in supporting brain function and cognitive processes in

birds, very similar to what has been reported for mammals. Yet, at the same time, studies of sleep in birds may also lead to surprising findings and novel insights. For example, it was recently shown that pectoral sandpipers are able to maintain high behavioural performance despite a massive reduction in sleep time during a 3-week period of intense male-male competition for access to fertile females (Lesku et al., Science 2012). Moreover, males that slept the least ultimately produced the most offspring. These findings challenge the common view emerging from studies in mammals that decreased performance is an inescapable outcome of sleep loss and beg for follow-up studies under more controlled conditions. However, detailed EEG studies in birds are scarce and none of these properly assessed sleep homeostatic responses to sleep deprivation, that is, measurement of sleep rebounds and sleep architecture after sleep deprivations of different durations (acute and chronic). While in that sense any bird species would be a valuable addition, for this project we selected the European starling and the jackdaw as a model species for experiments that will bridge the gap between ecological and evolutionary studies on sleep in birds and laboratory studies on the neurobiological and molecular underpinnings of sleep performed in rodents.

One bird species that is a particular suitable candidate for sleep studies is the European starling. In Groningen, this species has already been used in experimental settings under both semi-natural conditions and laboratory conditions (e.g., Wiersma et al., J Exp Biol 2005). It has the appropriate size for EEG recordings with miniature data loggers and we recently successfully performed the first recordings of basic sleep-wake patterns and homeostatic response to acute sleep deprivation (██████ et al., in progress). We now aim to extend these first recordings with measurements of sleep under conditions of more chronic sleep restriction and assessments of molecular correlates of sleep loss in brain tissue.

The second bird species of interest is the jackdaw. Among birds, the cognitive abilities of Corvids (jackdaws, crows and ravens) appear to be the most complex, in some cases comparable to those found only in primates (Clayton and Emery, Neuron 2015). Given their ability to perform complex tasks, and associated large brains, Corvids could serve as a powerful model in which to examine the role sleep plays in avian brain function and cognition. An unconfirmed early study on Corvids reported very low amounts of REM sleep (Szymczak, Acto Neurobiol Exp 1989), which again makes it an interesting model to study REM sleep homeostasis. As a first step towards developing this model, we aim to characterize the sleep patterns in jackdaws. Depending on the outcome and success of this first study and subsequent grant applications, we foresee future experiments in the jackdaw that are more specifically aimed at sleep and cognition.

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?

In this project we will assess sleep, sleep homeostasis and consequences of sleep deprivation in 3 non-rodent and/or non-mammalian species (tree shrew, starling and jackdaw). These studies are important to, A) confirm findings achieved in rats and mice, thereby providing important supports for the generalizability of these findings; or B) shed new light on aspects of sleep regulation and sleep homeostasis that may be specific for certain species. Importantly, the finding of species-specific aspects of sleep would fuel the concern that caution is required with extrapolation of results from studies in nocturnal rodents to other species (including humans).

The main aims of this project are:

- 1) Assessment of sleep-wake behavior and sleep architecture in the tree shrew, the jackdaw and the European starling by means of polysomnography under

different environmental conditions (different light conditions, different ambient temperatures, different social housing conditions). Published data suggest that sleep is sensitive to environmental conditions, including light and temperature, but few systematic studies in species other than nocturnal rodents have been performed. In certain species, sleep-wake patterns may be partly shaped by the social environment as well. Particularly in birds, the occurrence of unihemispheric sleep, which does not occur in laboratory rats and mice, may in part depend on the position of individuals in a group ([redacted] et al. Nature 1999).

2) Assessment of the homeostatic sleep response to sleep deprivation of different durations (i.e., the occurrence of a NREM and REM sleep rebounds). It is well established that humans, rats, and mice display a homeostatic response to sleep deprivation, that is, they catch up for lost sleep by showing a rebound sleep. This rebound is particularly clear for NREM sleep but less convincing (and perhaps species-dependent) for REM sleep. However, a careful and quantitative assessment of sleep homeostatic responses has been performed in few species other than the usual suspects (and none in birds). Moreover, most of the available data are concerned with acute sleep deprivation and little information exists on more chronically restricted sleep as it often occurs in the real world (e.g., in birds during the reproductive season when workload is high or in humans beings living in a modern 24/7 society). The jackdaw, starling and tree shrew are interesting models for a further phylogenetic analysis of the sleep homeostatic concept.

3) Assessment of the molecular correlates of sleep and sleep loss by collecting brain material after sleep deprivation or sleep restriction of different durations. This part of the project is directly driven by the hypothesis that sleep serves to support recovery and/or plasticity of the brain (i.e., nerve cells). Particularly, sleep is thought to be important for regulating synaptic strength. The popular synaptic homeostasis theory for sleep function postulates that synaptic strength increases in the course of wakefulness and that sleep serves to reverse this and bring the overall synaptic strength back to a baseline level. Accordingly, neuronal plasticity cascades that lead to synaptic strengthening are supposed to be activated during sleep deprivation and markers of synaptic strength such as glutamate receptor expression are expected to be increased. However, studies on the relationship between sleep, sleep deprivation and markers of synaptic strength and plasticity are largely restricted to mice and rats. We will extend our initial EEG studies in tree shrews and starling with assessment of molecular correlates of sleep and sleep loss by collecting brain tissue after different durations of sleep deprivation and/or subsequent recovery sleep. Based on the literature and on our own earlier work, brain tissue will be analyzed for, among others, elements of the cAMP-PKA-CREB signalling cascade and glutamate receptors.

Feasibility of the project:

We foresee no problems with the execution of this project. The selected species as well as all the required equipment for EEG recording and molecular analysis are available at our institute and the applicant has ample experience with these kind of studies (e.g., Coolen et al., Sleep 2012). The experiments are integrated in two ongoing PhD projects [redacted] Moreover, the studies are part of an ongoing collaboration with [redacted] within our own institute [redacted] and with [redacted] at the [redacted]

3.3 Belang

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

In addition to providing new knowledge on the biology of sleep in specific species (jackdaw, starling, tree shrew), these studies are of general importance

because they will provide important comparative data on the principle of sleep homeostasis and the consequences of sleep loss. These studies will be important in bridging the gap between ecological studies on sleep in non-rodent species and laboratory studies on the neurobiology of sleep performed in rats and mice. The findings in the proposed species may either, A) confirm findings achieved in rats and mice, thereby providing important supports for the generalizability of these findings; or B) not confirm findings in rats and mice, thereby warning against unfounded extrapolation from studies in nocturnal rodents and shed new light on certain aspects of sleep regulation and sleep homeostasis.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

The experiments in the different species can run largely independently from each other and are integrated in 2 PhD projects. Experiments in the tree shrew are a follow up from earlier studies and will be executed by the applicant and one PhD student [REDACTED]. These experiments will start soon upon approval of this application. Experiments in the two bird species are part of a second PhD project [REDACTED]. This part of the project will first continue with the starling and follows up the first recordings that were already performed in this species [REDACTED] (in progress). Experiments in the jackdaw will be performed in the second stage of the project.

Within each species the experiments will follow the same order as the numbered aims described in section 3.2. One, sleep-wake behavior and sleep architecture will be assessed by means of polysomnography under different environmental conditions (particularly, different light conditions, different ambient temperatures, and, in the starling, different social housing conditions). Two, animals will be subjected to sleep deprivation of different durations to assess the homeostatic sleep responses, that is, the magnitude and architecture of the rebound sleep during the recovery phase. Three, animals will be sacrificed after different durations of sleep deprivation and brain tissue will be collected to determine the neurobiological and molecular consequences of sleep loss. With this order, animals used for aims 1 and 2 can in some cases be re-used for experiments under aim 3.

In more detail for each of the 3 species:

In the tree shrew, we already performed and published the first study that assessed basic sleep-wake patterns and homeostatic recovery responses to short sleep deprivation (Coolen et al., Sleep 2012). In response to acute 6 or 12h sleep deprivation, tree shrews displayed an expected but modest NREM sleep rebound but no rebound of REM sleep whatsoever. Under main aim 1, we will investigate the regulation of REM sleep in more detail by examining the effect of sleep under different environmental conditions, particularly different light conditions and ambient temperature conditions. This is of interest since studies in rodents suggest that REM sleep in particular is sensitive to these environmental factors. Under main aim 2, we will subject tree shrews to selective REM sleep deprivation instead of the total sleep deprivation we used in prior studies as an additional approach to probe REM sleep regulatory mechanisms. Finally, under main aim 3, we will collect brain material from tree shrews after different durations of sleep deprivation to assess the molecular correlates of sleep loss. In the tree shrews this will be restricted to acute sleep deprivation by manual stimulation up to 12h in accordance with our published study (Coolen et al., Sleep 2012).

Also in the European starling we already performed the first studies to assess basic sleep-wake patterns and homeostatic recovery responses to short sleep deprivation, which are part of an ongoing PhD project [REDACTED]. In the first study, we assessed sleep and sleep homeostasis under standard laboratory conditions (LD 12/12, 21 C). In follow-up studies, we will extend these findings by assessing sleep under different environmental conditions (main aim 1), by assessing sleep under conditions of more chronic sleep restriction (main aim 2), and by assessing the molecular correlates of acute sleep

deprivation or chronic sleep restriction (main aim 3). Under main aim 2 and 3, we will follow up on the acute sleep deprivation studies by assessing sleep-homeostatic responses and molecular consequences of sleep loss in the starling under conditions of more chronic sleep restriction. We aim to perform a controlled laboratory study during which we will experimentally manipulate and reduce sleep time by making the birds work for their food according to well-established methodology in our institute (Wiersma et al., J Exp Biol 2005).

Finally, the jackdaw will be developed as a new species for sleep studies by experiments in accordance with main aim 1 and 2. Sleep-wake behavior and sleep architecture (amount and distribution of NREM and REM sleep), as well as the homeostatic recovery responses to brief sleep deprivation (increases in sleep duration or sleep intensity after different durations of acute sleep deprivation) will be determined by means of the well-validated and standard procedures also used for the other species. Depending on the outcome of this first study and whether or not jackdaws differ from other bird species such as the starling, we will decide on the strategy for future studies that may link sleep to the specific cognitive capabilities of jackdaws (new grant application and CCD application).

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 this project we study sleep in 3 different non-rodent species: the tree shrew, starling and jackdaw. The parallel between the studies in all 3 species is that experiments are aimed at determining sleep homeostasis and the effects of environmental conditions on sleep. Additionally, in 2 of the species for which sleep recordings were already developed (tree shrew and starling), we will assess the molecular correlates of sleep loss to test current hypothesis on the role of sleep in neuronal plasticity that are largely based on studies in rodents. The main research lines below are again numbered in accordance with the main aims described in section 3.2.

1) Assessment of sleep-wake patterns and sleep architecture under different environmental conditions (tree shrew, starling, jackdaw) = dierproef 1 (bijlage)

In these experiments we aim to assess how sleep is affected by different environmental conditions, particularly different light-dark conditions, different ambient temperatures, and, in the starling, different social housing conditions. Animals will undergo surgery to equip them with electrodes for recording brain activity (electroencephalogram, EEG) and muscle activity (electromyogram, EMG), which is required for distinguishing between wakefulness, NREM sleep and REM sleep. The experiments follow a standard protocol:

- surgery for implantation of EEG/EMG electrodes
- recovery and adaptation to the recording environment for 2 weeks
- 2 or 3 days recording of EEG/EMG signals to assess sleep-wake patterns and sleep architecture

2a) Assessment of sleep homeostatic responses to acute sleep deprivation of different durations (tree shrew, starling, jackdaw) = dierproef 2 (bijlage)

In these experiments we will measure sleep under baseline conditions and after acute sleep deprivation of different durations, up to a maximum duration of 12h. Sleep deprivation will be achieved by manual stimulation according to established procedures (sounds, gently touching the animals). The standard protocol for these experiments is:

- surgery for implantation of EEG/EMG electrodes (we aim to re-use animals as under 1)
- recovery from surgery and adaptation to the recording environment for 2 weeks
- 3 to 4 days recording of EEG/EMG signals to assess sleep-wake pattern and sleep architecture (baseline - sleep deprivation - recovery sleep)

2b) Assessment of sleep under conditions of working for food (only in the starling) = dierproef 3 (bijlage)

In these experiments in the starling, we will follow up on the acute sleep deprivation studies by measuring sleep-wake patterns under conditions of more

chronic sleep restriction. We will experimentally manipulate and reduce sleep time by making the birds work for their food according to well-established methodology in our institute (Wiersma et al., J Exp Biol 2005). The birds will be housed individually in flight cages where they can earn their food by flying between two perches. After training, sleep will be measured under conditions of different work load. The standard protocol of the experiments is:

- surgery for implantation of EEG/EMG electrodes (we aim to re-use animals under 1 and 2)
- recovery and adaptation to the flight cages for 2 weeks
- training birds to work for food
- recording of EEG/EMG signals under conditions of different work loads

3) Assessment of the molecular correlates of sleep loss by collecting brain material after sleep deprivation (tree shrew, starling) = dierproef 4 (bijlage)
We will extend our initial EEG studies in tree shrews and starling with assessment of molecular correlates of sleep loss by collecting brain tissue after different durations of sleep deprivation and/or subsequent recovery sleep. Acute sleep deprivation up to a maximum duration of 12h will be achieved by manual stimulation as (tree shrew, starling). Chronic sleep deprivation will be achieved by sleep deprivation by the working for food protocol (starling). Brains tissue will be collected for PCR, Western blot analysis, immunohistochemistry. This will be the final experiment, for which we can use animals that have already been included in 1 and 2.

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.

Much of our current the knowledge on sleep, particularly at the molecular level, is based on studies in rats and mice. This project will go beyond this narrow approach and broaden the view by studying sleep in 3 different non-rodent species - the tree shrew, the starling and the jackdaw - each chosen for specific reasons described above. The straightforward parallel between the studies in the different species is that all experiments are aimed assessing sleep homeostasis and how that is affected by environmental conditions. Additionally, in 2 of the 3 species for which sleep recordings were already developed - the tree shrew and starling - we will assess the molecular correlates of sleep loss to test current hypothesis on the role of sleep in neuronal plasticity that until now are largely based on studies in rodents.

As described in section 3.4.1, the studies in the 3 different species can run largely independent from each other but for each species there is a logical sequence in the experiments that follow the description of the aims in section 3.2:

- 1) Assessment of sleep-wake patterns and sleep architecture under different environmental conditions (in all species)
- 2) Assessment of homeostatic sleep responses to sleep deprivation of different durations, either acute (in all species) or chronic (in the starling)
- 3) Assessment of of the molecular correlates of sleep loss by collecting brain material after sleep deprivation (in tree shrews and starling). This will be the final experiment, for which we can use animals that have already been included in 1 and 2.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Assessment of sleep-wake patterns and sleep architecture under different environmental conditions
2	Assessment of sleep homeostatic response to sleep deprivation of different durations
3	Assessment of sleep under conditions of working for food
5	Collection of brain material after different durations of sleep deprivation and subsequent recovery sleep
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.	10500				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Rijksuniversiteit Groningen				
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>Assessment of sleep-wake patterns and sleep architecture under different environmental conitions</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Assessment of sleep-wake patterns and sleep architecture under different environmental conitions
Volgnummer	Type dierproef					
1	Assessment of sleep-wake patterns and sleep architecture under different environmental conitions					

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.

Published data suggest that sleep is sensitive to environmental conditions, including light and temperature, but few systematic studies in species other than nocturnal rodents have been performed. In certain species, sleep-wake patterns may be partly shaped by the social environment as well. Particularly in birds, the occurrence of unihemispheric sleep, which does not occur in laboratory rats and mice, may in part depend on the position of individuals in a group (██████████ et al. Nature 1999). In these experiments we will study how sleep in the tree shrew, starling and jackdaw is affected by different environmental conditions, particularly different light-dark conditions, different ambient temperatures, and, in the starling, different social housing conditions. The animals will be equipped with electrodes for recording brain activity (electroencephalogram, EEG) and muscle activity (electromyogram, EMG), which is necessary to be

able to distinguishing between wakefulness, NREM sleep and REM sleep. Based on the EEG/EMG recordings we will be able to assess detailed sleep-wake patterns and sleep architecture (NREM and REM sleep on 10 sec basis). In addition, the EEG signals will be subjected to spectral analysis that provides information about the quality and intensity of sleep. Particularly, EEG power in the 1-4Hz range is an established marker of NREM sleep intensity.

The standard protocol for the experiments is as follows:

- surgery for implantation of EEG/EMG electrodes
- recovery and adaptation to the recording environment for 2 weeks
- animals will be subjected to different conditions in a cross-over design, each time with sufficient time for habituation in between
- in each condition, EEG/EMG signals will be recorded for 3 days to assess sleep-wake patterns and sleep architecture

Animals will be exposed to the following varying environmental conditions:

- varying light/dark cycles (standard 12-12 LD cycle, LD cycle with short 2-6h light phase, LD cycle with long 18-22h light phase)
- varying ambient temperature (average temperature of 18-24C, low temperature of 0-6C, high temperature of 28-34C)
- varying social structure (isolated versus group housed; only in the starling)

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.

At the start of the project, the animals will undergo surgery for implantation of EEG electrodes for recording of cortical brain activity and EMG electrodes for recording of neck muscle activity. Surgeries will be performed under full isoflurane anaesthesia. Holes are drilled into the skull for placement of EEG electrodes on the cortex. The electrode plug is fixed on the skull with dental cement and the wound is closed tightly around it. After surgery, the animals will be allowed at least 1 week of recovery before the start of recordings. For experiments, the electrodes are connected to a miniature transmitter or datalogger (1,5-2g) that allow for wireless recordings in freely moving animals. Animals will be habituated to wearing a miniature datalogger by placing dummy loggers with gradually increasing weight during the recovery phase after surgery.

Sleep-wake patterns and sleep architecture will be measured for 2-3 days under various LD cycles and ambient temperatures. Each individual animal will be subjected to different LD cycles and different ambient temperatures. We will nest the different temperatures within the LD conditions so that animals will only have to adjust to each photoperiod once. There will be at least one week of adjustment time in between each new photoperiod-temperature condition prior to the 3 days of recording. The estimated duration of a full and continuous series of recordings in this case is: 3 different LD cycles x 3 different ambient temperatures x 10 days (7 habituation days + 3 recording days) = 90 days. These recordings will be performed in animals that are housed individually because the social housing in itself may cause major variation in sleep-wake patterns.

In the starling we will specifically address the question of social effects on sleep by comparing sleep of individually housed animals with sleep in socially housed animals. Also in this case, animals will be adapted to the different social housing conditions for at least a week prior to the EEG/EMG recordings. These recordings under different social housing conditions will be performed after the photoperiod-temperature experiments. In this case, the recordings are extended with another 2 x 10 days (isolated versus socially housed).

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

The number of animals will be minimized by studying the effects of varying environmental conditions in a cross-over design and a within-individual comparison. In other words, all animals will be subjected to multiple conditions. Once we have sleep data from the first recordings, power analysis will be applied where possible to estimate the required number of animals for further experiments.

B. De dieren

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

The studies will be performed in 3 different species:

- Tree shrew (colony of animals at our own institute, originally acquired from the breeding colony of collaborators in Gottingen); n=20; adult
- European starling (colony of wild-caught birds at our institute); n=20; adult
- Jackdaw (wild caught animals, covered by the license of our institute); n=20; adult

We have selected these 3 species because they are day-active, non-rodent species (as opposed to the nocturnal rats and mice, most commonly used in sleep research). In addition, the tree shrew belongs to a group of animals that is much closer to primates than to rodents and also in this sense looks more like humans than the usual rats and mice. Moreover, the tree shrew can be kept in a laboratory setting very well and is an established model for experimental research (Fuchs and Corbach-Sohle, UFAW Handbook 2010). Importantly, we already have experience with this species ourselves and the results acquired in our first experiments are partly driving the new experiments (Coolen et al., Sleep 2012).

We have selected the starling and the jackdaw also because they are birds, which, from a phylogenetic and evolutionary perspective, is an interesting group in itself. In general, birds have many features of sleep in common with mammals, including the occurrence of NREM and REM sleep (Siegel, Trends in Neurosci 2008). Moreover, various studies in birds have shown sleep-dependent learning and memory processes, in particular in relation to song learning (Brawn et al., J Neurosci 2010; Shank and Margoliash, Nature 2009). This suggests that sleep plays an important role in supporting brain function and cognitive processes in birds, very similar to what has been reported for mammals. Yet, at the same time, studies of sleep in birds may also lead to surprising findings and novel insights. For example, it was recently shown that pectoral sandpipers are able to maintain high behavioural performance despite a massive reduction in sleep time during a 3-week period of intense male-male competition for access to fertile females (Lesku et al., Science 2012). Moreover, males that slept the least ultimately produced the most offspring. These findings challenge the common view emerging from studies in mammals that decreased performance is an inescapable outcome of sleep loss and beg for follow-up studies under more controlled conditions. For that reason, we selected the European starling and the jackdaw as a model species for experiments that will bridge the gap between ecological and evolutionary studies on sleep in birds and laboratory studies on the neurobiological and molecular underpinnings of sleep performed in rodents. The starling has proven to be a suitable laboratory species and we have ample experience with these birds at our institute (e.g., Wiersma et al., J Exp Biol 2005). It has the appropriate size for EEG recordings with miniature data loggers and we recently successfully performed the first sleep recordings (██████████ in progress). The jackdaw is particularly interesting because it belongs to the Corvids, which are known for their cognitive abilities that appear to be the most complex among birds, in some cases comparable to those found only in primates (Clayton and Emery, Neuron 2015). Given their ability to perform complex tasks, and associated large brains, Corvids could serve as a powerful model in which to examine the role sleep plays in avian brain function. An unconfirmed early study on Corvids reported very low amounts of REM sleep (Szymczak, Acto Neurobiol Exp 1989), which again makes it an interesting model to study (REM) sleep homeostasis.

For none of the 3 selected species we have information on changes in sleep in response to varying LD cycles and ambient temperature. Based on our first studies under standard laboratory conditions (LD 12/12 and 21C) and the interindividual variation in sleep under these conditions, we expect that 20 animals should be enough to find effects of changing environmental conditions. This requested sample size includes an expected loss of 20% due to malfunctioning transmitters/loggers, disturbed EEG signals, loss of implants due to wear and tear in the course of experiments, etc.

Both sexes will be used in this study. In many experiments with mammalian rodent models, only males are used to avoid additional variation in behavior and physiology as a consequence of the estrous cycle. However, female tree shrews do not have a spontaneous estrous cycle, but instead are so-called "reflex ovulators", meaning that the reproductive cycle is induced by the presence of a male. Therefore, when female individuals are separated from males, they can be used for experimental research without the added variation caused by hormone cycling that occurs in most other laboratory species.

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.

Replacement is not possible. Sleep homeostasis is a complex phenomenon and our questions can only be addressed in living animals. We have also selected the 3 species for specific reasons as described under B.

To keep the number of animals to a minimum, we have chosen for a cross-over design and a within-individual comparison, as opposed to studying independent groups for each environmental condition.

Refinement is achieved by using state-of-the-art light-weight miniature transmitters or dataloggers, which allow for recording of EEG/EMG signals in freely moving animals as opposed to a tethered system with recording cables that is still applied in many sleep studies. Obviously, such tethered recordings would not work in birds. Even though the dataloggers are small and have very little weight, we will minimize the discomfort of wearing them by habituating the animals with dummy loggers of gradually increasing weight in the recovery week after surgery.

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.

Surgeries are performed under full anesthesia. Other than that, we do not anticipate major pain or suffering. The manipulations of environmental conditions in our studies are in the range of what these animals would experience under natural conditions and can be expected to adapt to.

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.

Based on literature search and attendance of major sleep conference in recent years, we are sure that similar studies in these species are not taking place anywhere else. Also, one the of the world's experts in [REDACTED] is a collaborator on this project.

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?

In addition to the surgery for implantation of EEG/EMG electrodes, covered under point H, wearing the EEG/EMG electrodes and dataloggers in itself may cause mild additional discomfort.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

The dataloggers on the head have a certain, minimal, weight that the birds have to carry around.

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

During the recovery week after surgery, health status and wound healing will be inspected on a regular basis and animals will be habituated to wearing the dataloggers using dummy loggers of gradually increasing weight.

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.

Occasionally, animals will lose the EEG implant, in which case the animal will be removed from the experiment and terminated.

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

The risk of losing an implant increases with longer duration experiments. Eventually this may be up to 20%.

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.

The main discomfort in these experiments stems from the surgery (moderate discomfort). The manipulations of the environmental conditions are withing

the natural range (mild discomfort). Since we allow animals full recovery before starting the EEG/EMG recordings and manipulation of the environmental conditions, the total discomfort of the experiment as a whole remains moderate.

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.

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.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 het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="2"/> | <input type="text" value="Assessment of sleep-homeostatic response to sleep deprivation of different durations"/> |

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.

It is well established that humans, rats, and mice display a homeostatic response to sleep deprivation, that is, they catch up for lost sleep by showing a rebound sleep. This rebound is particularly clear for NREM sleep but less convincing (and perhaps species-dependent) for REM sleep. However, a careful and quantitative assessment of sleep homeostatic responses has been performed in few species other than the beforementioned usual suspects. In this project, we will use the tree shrew, the starling and the jackdaw for a further phylogenetic analysis of the sleep homeostatic concept.

In each case, the standard protocol for the experiments is:

- surgery for implantation of EEG/EMG electrodes
- recovery from surgery and adaptation to the recording environment for 2 weeks
- 3 to 4 days recordings of EEG/EMG signals, which includes a baseline day, an experimental day with sleep deprivation, and subsequent recovery days
- animals will be subjected to different durations of sleep deprivation in semi-random order, each time with sufficient time for recovery in between

Based on the EEG/EMG recordings we will be able to assess sleep-wake patterns and distribution of NREM and REM sleep on a 10 sec basis. We will further be able to determine the precise sleep rebound after sleep deprivation, both in terms of compensatory sleep time as well as increased sleep intensity. Sleep intensity is reflected in spectral characteristics of the EEG. Particularly, EEG power in the 1-4Hz range has been established as a marker of NREM sleep intensity in several mammalian species. This EEG slow-wave activity increases as a function of the duration of prior wakefulness. In other words, the longer the animal is awake, the higher EEG slow-wave activity during subsequent NREM sleep.

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.

At the start of the project, the animals will undergo surgery for implantation of EEG electrodes for recording of cortical brain activity and EMG electrodes for recording of neck muscle activity. Surgeries will be performed under full isoflurane anaesthesia. Holes are drilled into the skull for placement of EEG electrodes on the cortex. The electrode plug is fixed on the skull with dental cement and the wound is closed tightly around it. After surgery, the animals will be allowed at least 1 week of recovery before the start of recordings. For experiments, the electrodes are connected to a miniature transmitter or datalogger (1,5-2g) that allow for wireless recordings in freely moving animals. Animals will be habituated to wearing a miniature datalogger by placing dummy loggers with gradually increasing weight during the recovery phase after surgery.

Sleep-wake patterns and sleep architecture will be measured for 3-4 days, which includes a baseline day, and experimental day with sleep deprivation, and 1 or 2 recovery days thereafter. During the experimental days, animals will be subjected to sleep deprivation for up to maximum duration of 12h (ranging between 3h and 12h). Each animal will be subjected to sessions of sleep deprivation of different durations (not more than 3), with at least one week in between the sessions to ensure full recovery. Multiple sleep deprivation sessions of different duration are required to establish the 'dose-response' relationship (dose= different durations of sleep deprivation; response = the magnitude of the sleep rebound in terms of both compensatory sleep time and sleep intensity).

Brief sleep deprivation will be achieved by manual stimulation whenever the animals displays signs of sleep. Stimulation primarily involves sounds made by ticking on the cage, gently shaking the cage, or if necessary gently touching the animal when it no longer responds to sounds or shaking. To specifically address the question of REM sleep homeostasis, in some experiments animals will be subjected to selective REM sleep deprivation by only stimulating the animals upon signs of REM sleep (transition from the high-amplitude slow-wave EEG pattern of NREM sleep to low-amplitude faster-wave REM sleep EEG pattern, as seen on the computer screen of the data collection system).

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

The number of animals will be minimized by studying the effects of different durations of sleep deprivation in a cross-over design and a within-individual comparison. In other words, all animals will be subjected to multiple sleep deprivation sessions. A week of recovery sleep in between the sessions is sufficient

for full recovery.

B. De dieren

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

The studies will be performed in 3 different species:

- Tree shrew (colony of animals at our own institute, originally acquired from the breeding colony of collaborators in Gottingen); n=20; adult
- European starling (colony of wild-caught birds at our institute); n=20; adult
- Jackdaw (wild caught animals, covered by the license of our institute); n=20; adult

We have selected these 3 species because they are day-active, non-rodent species (as opposed to the nocturnal rats and mice, most commonly used in sleep research). In addition, the tree shrew belongs to a group of animals that is much closer to primates than to rodents and also in this sense looks more like humans than the usual rats and mice. Moreover, the tree shrew can be kept in a laboratory setting very well and is an established model for experimental research (Fuchs and Corbach-Sohle, UFAW Handbook 2010). Importantly, we already have experience with this species ourselves and the results acquired in our first experiments are partly driving the new experiments (Coolen et al., Sleep 2012).

We have selected the starling and the jackdaw also because they are birds, which, from a phylogenetic and evolutionary perspective, is an interesting group in itself. In general, birds have many features of sleep in common with mammals, including the occurrence of NREM and REM sleep (Siegel, Trends in Neurosci 2008). Moreover, various studies in birds have shown sleep-dependent learning and memory processes, in particular in relation to song learning (Brawn et al., J Neurosci 2010; Shank and Margoliash, Nature 2009). This suggests that sleep plays an important role in supporting brain function and cognitive processes in birds, very similar to what has been reported for mammals. Yet, at the same time, studies of sleep in birds may also lead to surprising findings and novel insights. For example, it was recently shown that pectoral sandpipers are able to maintain high behavioural performance despite a massive reduction in sleep time during a 3-week period of intense male-male competition for access to fertile females (Lesku et al., Science 2012). Moreover, males that slept the least ultimately produced the most offspring. These findings challenge the common view emerging from studies in mammals that decreased performance is an inescapable outcome of sleep loss and beg for follow-up studies under more controlled conditions. For that reason, we selected the European starling and the jackdaw as a model species for experiments that will bridge the gap between ecological and evolutionary studies on sleep in birds and laboratory studies on the neurobiological and molecular underpinnings of sleep performed in rodents. The starling has proven to be a suitable laboratory species and we have ample experience with these birds at our institute (e.g., Wiersma et al., J Exp Biol 2005). It has the appropriate size for EEG recordings with miniature data loggers and we recently successfully performed the first sleep recordings (██████████ et al., in progress). The jackdaw is particularly interesting because it belongs to the Corvids, which are known for their cognitive abilities that appear to be the most complex among birds, in some cases comparable to those found only in primates (Clayton and Emery, Neuron 2015). Given their ability to perform complex tasks, and associated large brains, Corvids could serve as a powerful model in which to examine the role sleep plays in avian brain function. An unconfirmed early study on Corvids reported very low amounts of REM sleep (Szymczak, Acto Neurobiol Exp 1989), which again makes it an interesting model to study (REM) sleep homeostasis.

For none of the 3 selected species we have information on changes in sleep in response to varying LD cycles and ambient temperature. Based on our first studies under standard laboratory conditions (LD 12/12 and 21C) and the interindividual variation in sleep under these conditions, we expect that 20 animals should be enough to find effects of changing environmental conditions. This requested sample size includes an expected loss of 20% due to malfunctioning transmitters/loggers, disturbed EEG signals, loss of implants due to wear and tear in the course of experiments, etc.

Based on our experience and earlier studies in various species under standard laboratory conditions (LD 12/12 and 21C), we expect that a sample size of 20 should be enough to establish whether animals display a meaningful homeostatic response to acute total sleep deprivation or selective REM sleep deprivation (in the order of magnitude of 1 standard deviation in case of sleep deprivation of the shortest duration; although this may partly depend on the species and the specific read out of the sleep rebound, i.e. NREM sleep EEG slow-wave activity, NREM sleep time, REM sleep time). This requested sample size includes an expected loss of 20% due to disturbed EEG signals, malfunctioning transmitters/loggers, loss of implants due to wear and tear in the course of experiments, etc.

Both sexes will be used in this study. In many experiments with mammalian rodent models, only males are used to avoid additional variation in behavior and physiology as a consequence of the estrous cycle. However, female tree shrews do not have a spontaneous estrous cycle, but instead are so-called "reflex ovulators", meaning that the reproductive cycle is induced by the presence of a male. Therefore, when female individuals are separated from males, they can be used for experimental research without the added variation caused by hormone cycling that occurs in most other laboratory species.

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.

Animals from experiment 1 (assessment of sleep-wake patterns and sleep architecture under different environmental conditions) that are in good shape, have intact implants and good EEG signals, can be re-used for this second experiment after a proper period of recovery and re-adaptation to the standard conditions (LD 12/12 and 21C).

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.

Replacement is not possible. Sleep homeostasis is a complex phenomenon and our questions can only be addressed in living animals. We have also selected the 3 species for specific reasons as described under B.

To keep the number of animals to a minimum, we have chosen for a cross-over design and a within-individual comparison, as opposed to studying independent groups for each sleep deprivation session. We think this is justified because animals are expected to recover from brief sleep deprivation without long-lasting after effects.

Refinement is achieved by using state-of-the art light-weight miniature transmitters or dataloggers, which allow for recording of EEG/EMG signals in freely moving animals as opposed to a tethered system with recording cables that is still applied in many sleep studies. Obviously, such tethered recordings would not work in birds. Even though the dataloggers are small and have very little weight, we will minimize the discomfort of wearing them by habituating the animals with dummy loggers of gradually increasing weight in the recovery week after surgery.

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.

Surgeries are performed under full anesthesia. Other than that, we do not anticipate major pain or suffering. The maximum duration of sleep deprivation is within the range of a normal resting phase and considered mild.

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.

Based on literature search and attendance of major sleep conference in recent years, we are sure that similar studies in these species are not taking place anywhere else. Also, one of the world's experts in [REDACTED] a collaborator on this project.

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 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?

In addition to the surgery for implantation of EEG/EMG electrodes, covered under point H, wearing the EEG/EMG electrodes and dataloggers in itself may cause mild additional discomfort. Additionally, the animals will undergo multiple sessions (max 3) of brief sleep deprivation by manual stimulation (max 12h).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

The dataloggers on the head have a certain, minimal, weight that the birds have to carry around. Additionally, sleep deprivation by manual stimulation may cause mild discomfort because we expect that a need and drive for sleep will build up.

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

During the recovery week after surgery, health status and wound healing will be inspected on a regular basis and animals will be habituated to wearing the dataloggers using dummy loggers of gradually increasing weight. The discomfort of sleep deprivation cannot be avoided because it is our main experimental variable in this experiment, but the discomfort is mild because the duration is short and within the range of a normal resting phase (which in rodents still leads to a significant sleep rebound).

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.

Occasionally, animals will lose the EEG implant, in which case the animal will be removed from the experiment and terminated.

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

The risk of losing an implant increases with longer duration experiments. Eventually this may be up to 20%.

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.

The main discomfort in these experiments stems from the surgery (moderate discomfort). The duration of the sleep deprivation sessions is modest and within the range of a normal resting phase (mild discomfort). Since we allow animals full recovery before starting the EEG/EMG recordings and sleep deprivation sessions, the total discomfort of the experiment as a whole remains moderate.

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.

For the jackdaws, this sleep deprivation experiments are the final experiment and animals cannot be maintained for further experimentation. The starling and tree shrews that remain after this experiment can be used to collect brain material under experiment 4.

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.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 het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="3"/> | <input type="text" value="Assessment of sleep under conditions of working for food"/> |

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.

It is well established that humans, rats, and mice display a homeostatic response to sleep deprivation, that is, they catch up for lost sleep by showing a rebound sleep. This rebound is particularly clear for NREM sleep but less convincing (and perhaps species-dependent) for REM sleep. However, a careful and quantitative assessment of sleep homeostatic responses has been performed in few species other than the usual suspects. Moreover, most of the available data are concerned with acute sleep deprivation and little information exists on more chronically restricted sleep as it often occurs in the real world (e.g., in birds during the reproductive season when workload is high or in humans beings living in a modern 24/7 society).

In this experiment we will assess sleep and sleep homeostasis in the European starling under conditions of restricted sleep. Chronic manipulation of sleep time will be achieved by housing animals and in flight cages where they have to work for their food. The protocol for this experiment is:

- surgery for implantation of EEG/EMG electrodes
- recovery from surgery and adaptation to the flight cages for 2 weeks
- training birds to work for food
- recording EEG/EMG signals in birds on different work loads and, thereby, different degrees of chronic sleep disturbance

Based on the EEG/EMG recordings we will be able to assess sleep-wake patterns and distribution of NREM and REM sleep on a 10 sec basis. We will further be able to determine measures of sleep quality and sleep intensity on the basis of EEG spectral analysis. Particularly, EEG power in the 1-4Hz range has been established as a marker of NREM sleep intensity in several mammalian species.

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.

At the start of the project, the birds will undergo surgery for implantation of EEG electrodes for recording of cortical brain activity and EMG electrodes for recording of neck muscle activity. Surgeries will be performed under full isoflurane anaesthesia. Holes are drilled into the skull for placement of EEG electrodes on the cortex. The electrode plug is fixed on the skull with dental cement and the wound is closed tightly around it. After surgery, the animals will be allowed at least 1 week of recovery before the start of the experiments. For experiments, the electrodes are connected to a miniature transmitter or datalogger (1,5-2g) that allow for wireless recordings in freely moving animals. The birds will be habituated to wearing the miniature datalogger by placing dummy loggers with gradually increasing weight during the recovery phase after surgery.

After recovery from surgery, the birds will be housed individually in flight cages where they earn their food by flying between two perches (Wiersma et al., J Exp Biol 2005). The flight cages are 6.5 meters long (flight distance 6.15 m), and they will be fed with food they know from their standard housing conditions. The feeding perch is suspended from a load cell, allowing us to record mass every time a bird feeds. To expose birds to increasing work loads, they have to fly an increasing number of times between the perches to earn a food reward (e.g., 2, 4 or 6 return flights per food reward). An increase work load is will be applied to result in stronger restriction of sleep time. The birds will first be trained to work for food at the lowest possible level, i.e., a level at which they fly only little more than they would spontaneously. It is our earlier experience that the starlings quickly learn how to earn their food. After this initial training (about one week), the number of flights required per reward will gradually be changed to one of the three desired levels (2, 4 or 6 flights per reward, all above the spontaneous flight level). The animals will remain on this work load level for 10 days, and the last 3 days EEG will be recorded. The next two 10-day periods the birds will experience the other two workload levels, in a pre-determined order such that on balance there is no correlation between workload and order. If necessary, we will adjust the flight costs based on the behaviour and mass of the starlings in the course of the experiment, and the given numbers can therefore be considered upper limits of the work load that will be imposed.

The sleep variables that we will compare between treatments are total duration of sleep during the day and the night, the proportion and temporal distribution of time spent in different sleep stages (NREM and REM sleep), and the intensity of NREM sleep (EEG slow-wave activity sleep).

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

The number of animals will be minimized by studying the effects of different work loads in a cross-over design and a within-individual comparison. In other

words, all animals will be subjected to the 3 different work loads.

B. De dieren

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

European starling (colony of wild-caught birds at our Institute); n=20; adult (both sexes will be used)

We have selected the European starling for this experiment because it is a day-active and non-rodent species (as opposed to the nocturnal rats and mice most commonly used in sleep research). In addition, we have selected the starling because it is a bird species, which, from a phylogenetic and evolutionary perspective, is an interesting group in itself. In general, birds have many features of sleep in common with mammals, including the occurrence of NREM and REM sleep (Siegel, Trends in Neurosci 2008). Moreover, various studies in birds have shown sleep-dependent learning and memory processes, in particular in relation to song learning (Brawn et al., J Neurosci 2010; Shank and Margoliash, Nature 2009). This suggests that sleep plays an important role in supporting brain function and cognitive processes in birds, very similar to what has been reported for mammals. Yet, at the same time, studies of sleep in birds may also lead to surprising findings and novel insights. For example, it was recently shown that pectoral sandpipers are able to maintain high behavioural performance despite a massive reduction in sleep time during a 3-week period of intense male-male competition for access to fertile females (Lesku et al., Science 2012). Moreover, males that slept the least ultimately produced the most offspring. These findings challenge the common view emerging from studies in mammals that decreased performance is an inescapable outcome of sleep loss and beg for follow-up studies under more controlled conditions. For that reason, we selected the European starling as a model species for experiments that will bridge the gap between ecological and evolutionary studies on sleep in birds and laboratory studies on the neurobiological and molecular underpinnings of sleep performed in rodents. Finally, the starling has proven to be a suitable laboratory species and we have ample experience with these birds at our institute (e.g., Wiersma et al., J Exp Biol 2005). It has the appropriate size for EEG recordings with miniature data loggers and we recently successfully performed the first sleep recordings [redacted] et al., in progress).

We have no information on sleep and changes in sleep under conditions of increased workload but we expect that 20 animals should be enough to establish the sleep changes in response to increasing work load. This requested sample size includes an expected loss of 20% due to malfunctioning dataloggers, disturbed EEG signals, loss of implants due to wear and tear in the course of experiments, 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.

Animals from experiments described in 'bijlage dierproef 1/2' that are in good shape, have intact implants and good EEG signals, can be re-used for this experiment after a proper period of recovery and adaptation to the flight cages.

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.

Replacement is not possible. Sleep and sleep homeostasis are a complex phenomenon and our questions can only be addressed in living animals. We have selected the starling as our model species because: A) it is a bird as opposed to the rodents that are usually used for sleep restriction studies; B) it has the right size to carry a datalogger without being hampered in flight; and C) we have experience with this species in the flight cage set up.

To keep the number of animals to a minimum, we have chosen for a cross-over design and a within-individual comparison, as opposed to studying independent groups for each work load.

Refinement is achieved by using state-of-the art light-weight miniature transmitters or dataloggers, which allow for recording of EEG/EMG signals in freely moving animals as opposed to a tethered system with recording cables that is still applied in many sleep studies. Obviously, such tethered recordings would not work in starling that need to fly and work for food. Even though the dataloggers are small and have very little weight, we will minimize the discomfort of wearing them by habituating the animals with dummy loggers of gradually increasing weight in the recovery week after surgery. Also, during the working for food protocol, the mass of the birds is automatically recorded which provides us with an online indicator of the health status of the animals. If necessary, we will reduce the work load when the body mass of a starling drops below 65 grams (which is a safe minimum for the adult starling based on earlier studies).

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.

Surgeries are performed under full anesthesia. Other than that, we do not anticipate major pain or suffering. The suffering related to working for food is expected to be mild because this manipulation is comparable to what starlings experience under natural conditions and can adapt to.

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.

Based on literature search and attendance of major sleep conference in recent years, we are sure that similar studies are not taking place anywhere else.

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.

The birds will be housed in our flight cages where they have to work for a living. Fresh drinking water is always present, and water for bathing is presented daily unless EEG is recorded (since the dataloggers are water sensitive).

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?

In addition to the surgery for implantation of EEG/EMG electrodes, covered under point H, wearing the EEG/EMG electrodes and dataloggers in itself may cause mild additional discomfort. Additionally, the animals will be trained to work for their food.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

The dataloggers on the head have a certain, minimal weight that the birds have to carry around. Additionally, the working for food protocol forces animals to be active beyond their spontaneous activity under standard lab conditions.

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

During the recovery week after surgery, health status and wound healing will be inspected on a regular basis and animals will be habituated to wearing the dataloggers using dummy loggers of gradually increasing weight. The discomfort associated with the working for food protocol cannot be avoided because it is our main experimental variable in this study, but we consider this discomfort to be mild because the manipulation is comparable to what starlings experience under natural conditions, i.e., variation in the amount of work required to gain food. Also, the work load will remain below what starlings can maximally do as assessed in this setup in previous experiments (Wiersma et al., J Exp Biol 2005). Importantly, the automated recording of body weight during the working for food protocol allows us to signal problems early and if necessary the work load will be adapted.

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.

Occasionally, animals will lose the EEG implant, in which case the animal will be removed from the experiment and terminated.

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

The risk of losing an implant increases with longer duration experiments. Eventually this may be up to 20%.

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.

The main discomfort in these experiments stems from the surgery (moderate discomfort). The working for food protocol, as it is a naturalistic approach, will result in mild discomfort. Since we allow animals full recovery from surgery before starting the working for food training sessions, the total discomfort of the experiment as a whole remains moderate.

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.

The starlings that remain after this experiment can be used to collect brain material under experiment 4.

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.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 het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|--------------------------------|--|
| <input type="text" value="4"/> | <input type="text" value="Collection of brain material after different durations of sleep deprivation and subsequent recovery sleep"/> |

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.

These experiments are driven by the hypotheses that sleep serves to support recovery and/or plasticity of the brain (i.e, nerve cells). Particularly, sleep is thought to be important for regulating synaptic strength. However, studies on the relationship between sleep, sleep deprivation and markers of synaptic strength and plasticity are largely restricted to mice and rats. We will extend our initial EEG studies on sleep homeostasis in tree shrews and starlings with an assessment of the molecular correlates of sleep and sleep loss by collecting brain tissue after different durations of sleep deprivation and/or subsequent recovery sleep.

This experiment will be performed in tree shrews and starling. Brains will be collected after specific periods of acute sleep deprivation by manual stimulation for up to 12h or after a day of recovery sleep (in accordance with experiments described in 'bijlage dierproef 2'). In the starling, we will additionally collect brains after 10 days chronic sleep manipulation by the working-for-food protocol or after a 1 or 5 days of recovery sleep (in accordance with experiments described in 'bijlage dierproef 3').

Brains will be collected fresh or by perfusion fixation, depending on the requirements of subsequent analysis procedures (i.e, PCR, Western blot, immunohistochemistry). Based on the literature and on our own earlier work, brain tissue will be analyzed for, among others, elements of the cAMP-PKA-CREB signalling cascade and glutamate receptors.

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

In accordance with experiments described in 'bijlage dierproef 2', brief sleep deprivation in the tree shrews and starling will be achieved by manual stimulation whenever the animals displays signs of sleep. Stimulation primarily involves sounds made by ticking on the cage or if necessary gently touching the animal when it no longer responds to sounds. To specifically address the question of REM sleep homeostasis, in some experiments animals will be subjected to selective REM sleep deprivation by only stimulating the animals upon signs of REM sleep (transition from the high-amplitude slow-wave EEG pattern of NREM sleep to low amplitude faster-wave REM sleep EEG pattern, as seen on the computer screen of the data collection system). In this experiment, because the brain collection is a terminal experiment, the animals can only be subjected to 1 single treatment (no sleep deprivation, sleep deprivation, sleep deprivation + recovery sleep).

In accordance with experiments described in 'bijlage dierproef 3', chronic sleep disturbance in the starling will be achieved by making them work for their food. These birds will be housed individually in 6,5 m long flight cages where they earn their food by flying between two perches. To reduce the number of animals and the costs of this experiment, the birds will be exposed to only one work load, that is, the work load which in previous experiment had the strongest effect on sleep time and sleep architecture. Because the chronic sleep disturbance protocol may result in cumulative and more persistent changes in the brain (e.g., Roman et al. 2005), we think it is important to collect brain for assessment of acute recovery (1 day) and long term recovery (5 days). In this experiment, because the brain collection is a terminal experiment, the animals can only be subjected to 1 single treatment (control =no working for food, working for food, working for food + 1d recovery, working for food + 5d recovery).

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

A reasonable estimate of the number of animals required for the brain analysis can be made after we have established the magnitude of the sleep changes in experiment 2 and 3. Based on the results from the EEG studies and changes in sleep, we will apply a power analysis to calculate the number of animals required for the brain analysis. Also, in the working for food experiment in starling, we minimize the number of animals by selecting only the workload that has the biggest effect in experiment 3.

B. De dieren

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

Tree shrew (we are establishing a breeding colony from the animals that are currently available at our institute); adult animals; n=80 total

- control (no sleep deprivation)
- sleep deprivation duration 1
- sleep deprivation duration 2 (max 12h)
- recovery 1d

n=10 per group x 4 treatment groups x 2 brain collection methods (fresh or fixation) = 80 animals

European starling (wild caught animals); adult animals; n=80 total

- control (no sleep deprivation)
- sleep deprivation duration 1
- sleep deprivation duration 2 (max 12h)
- recovery 1d

n=10 per group x 4 treatment groups x 2 brain collection methods (fresh or fixation) = 80 animals

European starling (wild caught animals); adult animals; n=80 total

- control = no working for food
- working for food
- working for food + recovery 1d
- working for food + recovery 5d

n=10 per group x 4 treatment groups x 2 brain collection methods (fresh or fixation) = 80 animals

We have selected the tree shrew and the starling because they are day-active and non-rodent species (as opposed to the nocturnal rats and mice, most commonly used in sleep research). In addition, the tree shrew belongs to a group of animals that is much closer to primates than to rodents and also in this sense looks more like humans than the usual rats and mice. Moreover, the tree shrew can be kept in a laboratory setting very well and is an established model for experimental research (Fuchs and Corbach-Sohle, UFAW Handbook 2010). Importantly, we already have experience with this species ourselves and the results acquired in our first experiments are partly driving the new experiments (Coolen et al., Sleep 2012).

We have selected the starling also because they are birds, which, from a phylogenetic and evolutionary perspective, is an interesting group in itself. In general, birds have many features of sleep in common with mammals, including the occurrence of NREM and REM sleep (Siegel, Trends in Neurosci 2008). Moreover, various studies in birds have shown sleep-dependent learning and memory processes, in particular in relation to song learning (Brawn et al., J Neurosci 2010; Shank and Margoliash, Nature 2009). This suggests that sleep plays an important role in supporting brain function and cognitive processes in birds, very similar to what has been reported for mammals. Yet, at the same time, studies of sleep in birds may also lead to surprising findings and novel insights. For example, it was recently shown that pectoral sandpipers are able to maintain high behavioural performance despite a massive reduction in sleep time during a 3-week period of intense male-male competition for access to fertile females (Lesku et al., Science 2012). Moreover, males that slept the least ultimately produced the most offspring. These findings challenge the common view emerging from studies in mammals that decreased performance is an inescapable outcome of sleep loss and beg for follow-up studies under more controlled conditions. For that reason, we selected the starling as a model

species for experiments that will bridge the gap between ecological and evolutionary studies on sleep in birds and laboratory studies on the neurobiological and molecular underpinnings of sleep performed in rodents.

Both sexes will be used in this study. In many experiments with mammalian rodent models, only males are used to avoid additional variation in behavior and physiology as a consequence of the estrous cycle. However, female tree shrews do not have a spontaneous estrous cycle, but instead are so-called "reflex ovulators", meaning that the reproductive cycle is induced by the presence of a male. Therefore, when female individuals are separated from males, they can be used for experimental research without the added variation caused by hormone cycling that occurs in most other laboratory species.

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.

Animals from experiments described in 'bijlage dierproef 1-3' that are in good shape can be re-used for this final experiment after a proper period of recovery.

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.

Replacement is not possible. Sleep homeostasis is a complex phenomenon and our questions can only be addressed in living animals. We have also selected the tree shrew and the starling for specific reasons as described. To keep the number of animals to a minimum, in the working for food paradigm we only apply the work load that has the biggest effect in experiment 3.

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

We do not anticipate major pain or suffering.

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.

Based on literature search and attendance of major sleep conference in recent years, we are sure that similar studies in these species are not taking place anywhere else. Also, one the of the world's experts in [REDACTED] is a collaborator on this project.

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.

The starlings in the working-for-food experiment will be housed in our flight cages where they have to work for a living. Fresh drinking water is always present, and water for bathing is presented daily.

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?

Acute sleep deprivation by manual stimulation or chronic sleep disturbance induced by the working-for-food protocol.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

The sleep deprivation by manual stimulation or chronic sleep disturbance by the working-for-food protocol may cause mild discomfort because we expect that a need and drive for sleep will build up. Additionally, the working-for-food protocol forces animals to be active beyond their spontaneous activity under standard lab conditions.

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

The discomfort of acute sleep deprivation or chronic sleep disturbance cannot be avoided because it is our main experimental variable in this study. However, the discomfort of the acute sleep deprivation is mild because the duration is short and within the range of a normal resting phase (which in rodents still leads to a significant sleep rebound). We also consider the discomfort of the working-for-food protocol to be mild because this manipulation is comparable to what starlings experience under natural conditions, i.e., variation in the amount of work required to gain food. Also, the work load will remain below what starlings can maximally do as assessed in this setup in previous experiments (Wiersma et al., J Exp Biol 2005).

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.

Both the acute sleep deprivation and the working-for-food protocol produce mild discomfort.

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.

This main aim of this experiment is to collect brain material for assesment of the molecular correlates of sleep homeostasis.

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

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van het Ethisch Toetsingskader en de bijbehorende toelichting waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toelicht.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: (Intern RUG code **9003**)
2. Titel van het project: **Comparative studies on the regulation of sleep and the consequences of sleep loss**
3. Titel van de NTS: **Vergelijkende studies aan de regulatie van slaap en gevolgen van slaapttekort.**
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning**
5. Contactgegevens DEC: -
 - naam DEC : **DEC-RUG**
 - telefoonnummer contactpersoon: XXXXXXXXXX
 - mailadres contactpersoon : XXXXXXXXXX
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: **09-09-2015**
 - aanvraag complete: **09-09-2015**
 - in vergadering besproken: **17-09-2015**
 - anderszins behandeld: **30-11-2015**
 - termijnonderbreking(en) van / tot: **18-09-2015 tot 27-11-2015**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen. **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag: **27-11-2015**
 - advies aan CCD: **23-12-2015**
7. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen

- Strekking van het (de) antwoord(en)
- Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **18-09-2015**
- Strekking van de vraag / vragen:

Vragen t.a.v. de projectbeschrijving

De onderliggende redenen voor de keuzen voor de diersoorten lijkt ingegeven door lokale beschikbaarheid. Vanuit een vergelijkend standpunt is dit niet *per se* overtuigend, want daarvoor moet helder zijn welke specifieke vraag met welke soort het best te beantwoorden is. Twee vogelsoorten zeggen niet *per se* iets over vogels als geheel (wat is hun fylogenetisch relatie?). Dat de kauw slim is, is helder, maar waarom die dan geschikt is voor dit onderzoek niet. Tenzij in een later stadium de relatie tussen slimheid en slaapdeprivatie nader bekeken wordt. Bovendien stelt u zelf dat per soort bijzondere aanpassingen kunnen plaatsvinden (getuned naar lokale ecologische omstandigheden). Kunt u de keuzes voor de diersoorten specifieker onderbouwen?

Zijn de data van ratten en muizen op zich vergelijkbaar? Want als die al verschillen is de tegenstelling met nacht-actieve *rodents* niet helemaal juist. En zijn daar stamverschillen gevonden die al iets meer vertellen over regulatie en functie?

Vragen t.a.v. de bijlages

De dieren in het experiment worden solitair gehouden tijdens de metingen: wat zijn de effecten daarvan? Hoe worden de mogelijk negatieve effecten, als die er zijn, geminimaliseerd?

Er wordt gesuggereerd dat sociale huisvesting een effect heeft op slaap. Wat dan? En hoe relateert dit aan generaliseerbaarheid naar bijvoorbeeld mensen, die toch sociaal leven?

Worden beide seksen gebruikt?

Hoe veranderen laboratorium condities slaap-waak ritmes en wat zeggen die mogelijke veranderingen dan over de beoogde vergelijkbaarheid van soorten? Dit is van belang voor met name de relatie naar de kauw: zijn dit wildvang dieren (aanvraag suggereert dit)? Hoe lang worden die gehabitueerd aan de nieuwe situatie?

Zijn er *a priori* hypothesen te formuleren over de veranderingen in de hersenen?

Het verhogen van de *workload* als een manier om slaapdeprivatie te induceren: in hoever zijn de waargenomen effecten op het EEG/EMG specifiek voor chronische slaapdeprivatie en niet voor metabole of andere aanpassingen? Zijn er geen controles hiervoor nodig?

- Datum antwoord: **27-11-2015**

Strekking van het (de) antwoord(en): De gevraagde verduidelijkingen zijn verwerkt in het projectvoorstel en de bijlages. De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) **n.v.t.**

- Aard expertise
- Deskundigheid expert

- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Expert advies

10. Advies van IvD

- Datum advies IvD: **17-09-2015**
- Strekking advies IvD (*zie opmerking toelichtingsdocument*)

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.

Ja, het project is vergunningplichtig

Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja**

4. Zijn DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies? **Nee.**

C. Beoordeling (inhoud):

1. Is de aanvraag een toetsbare eenheid? Leg uit waarom wel/niet. Geef hierbij ook aan of 1) de aanvraag als programma of project getypeerd wordt (Een programma omvat meerdere projecten en heeft een hoger gelegen doel, terwijl een project een concrete onderzoeksvraag heeft met in principe één concrete doelstelling en een helder geformuleerd resultaat), 2) het project coherent is, waarbij alle dierexperimenten logisch samenhangen en nodig zijn om het beoogde concrete resultaat te bereiken en 3) alle stappen in het project voldoende zijn uitgewerkt en geen onzekerheden bevatten, die voor de ethische toetsing relevant zouden kunnen zijn.

Ja, de aanvraag kan als een toetsbare eenheid worden beschouwd:

het gaat om onderzoek aan drie diersoorten die als samenhangend doel hebben slaap in andere dan rodent species te begrijpen en daarmee kennis te vergroten over slaap *per se* en de extrapoleerbaarheid van gegevens. De aanvraag heeft het karakter van een project waarin drie afzonderlijke en goed beschreven onderzoeksvragen in drie diersoorten tezamen een beeld geven van slaap. (zie opmerking toelichtingsdocument)

2. Zijn er aspecten in deze aanvraag die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod, zoals bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren? Indien van toepassing, leg uit waarom.

Nee

3. Is/zijn de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en)?

JA

Belangen en waarden

4. Wat is het motiverende doel van het project? (Zie ETK, Doeleinden project pag. 2).

Het betreft fundamenteel onderzoek.

5. Wat is het effect van het onderzoek op het welzijn van mens, dier en omgeving en wetenschappelijke kennis (zie tabel 1 van het ETK)?

Het project beoogt wetenschappelijk kennis over slaap te vergroten wat uiteindelijk ook toepasbaar kan zijn voor het beter begrijpen van slaap bij mensen

6. Worden de belangen van dieren, consumenten, burgers en omgeving (in termen van waarden) voldoende beschreven of zijn er overige belangen die voor de toetsing relevant zijn (zie tabel 2 van het ETK)? Specificeer de belangrijkste belanghebbenden (kwalitatief en kwantitatief).

Ja, er wordt voldoende beschreven waarom dieren worden gebruikt en hoe het welzijn van de dieren wordt geborgd en ongerief/pijn wordt voorkomen. *(zie opmerking toelichtingsdocument)*

7. Benoem de waarden die in het geding zijn voor de belangrijkste belanghebbenden.

Proefdieren: welzijn, autonomie en rechtvaardigheid

Onderzoekers: autonomie

8. Is er sprake van belangwekkende milieueffecten? Zo ja, leg uit waarom.

NEE

Proefopzet en haalbaarheid

9. Is het project goed opgezet? Leg uit waarom wel/niet.

Ja, de experimenten volgen de in slaaponderzoek gangbare manieren en technieken.

10. Zijn kennis en kunde van onderzoekers en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd? Licht toe waar dit uit blijkt?

Ja, de onderzoekers en (bio)technici hebben een trackrecord in dit slaaponderzoek. Nieuwe medewerkers worden door bekwame personen opgeleid.

11. Kan de gekozen strategie en experimentele aanpak leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project (*Zie ETK, Haalbaarheid pag. 4*)? Leg uit waarom wel/niet.

Ja, op deze wijze zal kennis over slaap en extrapoleerbaarheid worden verkregen.

Welzijn dieren

12. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Geef aan of en waarom de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk onderbouwd is.

De onderzoekers gebruiken tree-shrews, spreeuwen en kauwen. Ten aanzien van de kauwen is goed beschreven wat de reden is voor de keuze van deze soort. De spreeuw is wildvang. (zie opmerking toelichtingsdocument)

Hieronder de tabel bijzonderheden

- Bedreigde diersoort(en) (10.e.4)
- Niet-menselijke primaten (10.e)
- Dieren in/uit het wild (10.f)**
- Gefokt voor dierproeven (11)
- Zwerfdieren (10.h)
- Hergebruik (1.e.2)
- Huisvesting en verzorging
- Locatie: instelling vergunninghouder (10.g)
- Toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)

- Dodingsmethode (13.c.3)

13. Is de kwaliteit van de huisvesting en verzorging volgens bijlage III van de richtlijn? Wordt de kwaliteit van de huisvesting en verzorging, indien afwijkend van bijlage III, voldoende geborgd? Leg uit waarom wel/niet.

De dieren worden gehuisvest volgens de richtlijnen. (zie opmerking toelichtingsdocument)

14. Is het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch ingeschat en geclassificeerd? Leg uit waarom wel/niet.

Ja, dit is realistisch ingeschat.

15. Is er sprake van integriteitsaantasting? Leg uit waarom wel/niet (Zie ETK, Waarden, pag. 4).

Ja. Als een dierproef meer dan een injectie door een dierenarts behelst is per definitie de integriteit (van in ieder geval weefsels) aangetast. *(zie opmerking toelichtingsdocument)*

3V's

17. Heeft de aanvrager een overzicht gegeven van alle potentiële vervangingsalternatieven en heeft de aanvrager daar een gemotiveerde keuze in gemaakt? Onderschrijft de DEC deze keuze? Leg uit waarom wel/niet *(Zie ETK, subsidiariteit, pag. 4)*.

Ja, slaap onderzoek kan alleen in levende organismen worden gedaan *(zie opmerking toelichtingsdocument)*

18. Is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat? Is er een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Leg uit waarom wel/niet *(Zie ETK, subsidiariteit, pag. 4)*.

Ja, het aantal dieren is beperkt tot wat wetenschappelijk kan worden verantwoord. *(zie opmerking toelichtingsdocument)*

19. Is het project in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en is het project zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd? Leg uit waarom wel/niet *(Zie ETK, subsidiariteit, pag. 4)*.

Ja, experimenten worden zodanig gedaan dat ongerief tot een minimum wordt beperkt.

20. Zijn er redenen om aan te nemen dat, bij wettelijk vereist onderzoek, duplicatie plaats vindt? Zo ja, licht dit toe.

a. Beschikt de aanvrager over voldoende expertise en informatie om tijdens het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt? Leg uit waarom wel/niet.

NVT

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

21. Worden dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet? Zo nee, is daarvoor een actuele wetenschappelijke onderbouwing? Welke maatregelen zijn verder getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken (*Zie ETK, proportionaliteit en voorzorg, pag. 4*)?

Ja, beide seksen worden gebuikt.

22. Worden dieren gedood in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef)? Is dit noodzakelijk en wordt een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt (*Zie ETK, proportionaliteit en voorzorg, pag. 3*)? Licht dit toe.

Ja, er worden moleculaire analyses gedaan op hersenstructuren. Hiertoe worden de daartoe geëigende en geschikte dodingsmethoden gebruikt.

23. Indien dieren worden gedood, is adoptie of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is (*Zie ETK, proportionaliteit en voorzorg, pag. 3*).

Dit is niet mogelijk ivm analyses (zie boven)

NTS

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

JA

D. Ethische afweging

1. Benoemen de centraal morele vraag (*Zie ETK, Probleem definiëren, pag. 9*).

Het verkrijgen van meer kennis over slaap rechtvaardigt het gebruik van dieren en het mogelijk ongerief dat wordt aangedaan

2. Weeg voor de ethische afweging de waarden van de verschillende belanghebbenden zoals beschreven in C ten opzichte van elkaar af. Onderbouw dit met moreel relevante feiten (*Zie ETK, Waarden, pag. 4 en Weging moreel relevante argumenten, pag. 11*).

Autonomie van onderzoek aan de kant van de onderzoeker; welzijn, autonomie en rechtvaardigheid aan de kant van het dier.

3. Beantwoord de centraal morele vraag, gebruik makend van bovenstaande afweging. Motiveer de afweging, zodanig dat deze navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel.

Onderzoek naar slaap buiten de mens als proefpersoon en buiten rodents die veel gebruikt zijn, is nodig om de functie en evolutie van slaap in brede zin te begrijpen. Onderzoek aan slaap bij mensen is zeer beperkt in zijn mogelijkheden van het begrijpen van moleculaire processen onderliggend/gekoppeld aan slaap. Het gebruik van de diersoorten zoals hier benoemd is daarom te rechtvaardigen. Hoewel de dieren worden geschaad in hun belangen (immers ze ervaren bijvoorbeeld ongerief door de procedures) is dit door de onderzoekers beperkt en weegt dit op tegen het belang van het onderzoek.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.**
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus of op een meerderheids-minderheidsstandpunt. Specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie ETK, Advies pag. 12*).

CONCENSUS

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie ETK, Proportionaliteit en voorzorg pag. 3, Subsidiariteit pag. 4, Dilemma's pag. 8 en Advies pag. 12*).

Indien van toepassing zullen dergelijke aspecten onder D3 worden verwerkt.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,

9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD105002015359

Bijlagen

2

Datum 28 december 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 23 december 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002015359. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10500
Naam instelling of organisatie: Rijksuniversiteit Groningen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 1179037
Straat en huisnummer: A. Deusinglaan 1 [REDACTED]
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN
IBAN: NL45ABNA0474567206
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Rijksuniversiteit Groningen

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Adres: A. Deusinglaan 1, [REDACTED]
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

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 november 2015
Geplande einddatum: 1 november 2020
Titel project: Comparative studies on the regulation of sleep and consequences of sleep loss
Titel niet-technische samenvatting: Vergelijkende studies aan de regulatie van slaap en gevolgen van slaapttekort
Naam DEC: [REDACTED]
Postadres DEC: A. Deusinglaan 1, [REDACTED]
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.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: Melding Machtiging
 DEC-advies

Ondertekening

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Groningen



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,

9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD105002015359

Bijlagen

2

Datum 28 december 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 28 december 2015

Vervaldatum: 27 januari 2016

Factuurnummer: 15700359

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD105002015359	€ 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

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1

9713 AV Groningen



**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
AVD105002015359

Uw referentie

Bijlagen

Datum 14 januari 2016

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte

Op 24 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Comparative studies on the regulation of sleep and the consequences of sleep loss' met aanvraagnummer AVD105002015359. 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 beschrijft u verschillende proeven met tupaia, spreeuwen en kauwen. 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 tupaia, spreeuwen en kauwen te willen gebruiken. Het is voor ons niet duidelijk op welk moment van de dag worden de testen uitgevoerd (24 uur, alleen over dag/'s nachts). Vooral in het geval van slaaptekort is het belangrijk in het kader van haalbaarheid van de doelstelling om te weten of de dieren doorlopend gemonitord zijn, en of het slaaptekort over dag en 's nachts plaatsvindt en wordt getest. Aangezien uw onderzoek gericht is op slaap patronen en homeostase, kan het moment van het testen van de dieren een grote invloed hebben op de resultaten. We verzoeken u om dit punt uit te werken.

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 uw aanvraag in de

eerstvolgende vergadering van de CCD te kunnen behandelen, verzoeken we u om uw antwoord uiterlijk dinsdag, 19 januari 2016, naar ons toe te sturen.

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

Vragen van CCD over projectaanvraag AVD105002015359

Vraag 1: In het projectvoorstel bijlage van uw aanvraag beschrijft u verschillende proeven met tupaia, spreeuwen en kauwen. 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.

Wij hebben het project zo veel mogelijk opgezet zoals dat ook wordt gedaan voor beursaanvragen, waarbij elk individueel experiment waardevolle informatie zal verschaffen zonder dat het afhankelijk is van de uitkomst van andere experimenten. In dat opzicht zijn er slechts een beperkt aantal no-go momenten.

Voor wat betreft de verschillende behandelingen binnen proeven zijn er geen no-go momenten. Om een nauwkeurig beeld te krijgen van de effecten van omgevingsinvloeden op slaap zijn in de experimenten beschreven in bijlage 1 "sleep under different environmental conditions" elk van de verschillende temperaturen, verschillende LD cycli, en verschillende sociale structuren nodig. Het effect van een lage omgevingstemperatuur is immers niet noodzakelijkerwijs voorspellend voor het effect van een hoge temperatuur; evenmin zullen de resultaten van slaap gemeten onder korte dag de waarde en noodzaak van metingen bij lange dag beïnvloeden; ook kan de invloed van sociale structuur alleen worden vastgelegd wanneer slaap zowel wordt gemeten in isolatie als in groepshuisvesting. Hetzelfde geldt voor de experimenten beschreven in bijlage 2 "sleep deprivation of different durations". Elke diersoort wordt blootgesteld aan minimaal 2 verschillende duren van slaapdeprivatie, hetgeen nodig is om een minimale slaap homeostatische 'dosis-repons' te bepalen. Belangrijk gegeven in het kader van vermindering is bovendien dat in alle proeven beschreven in bijlage 1, 2 en 3 telkens dezelfde dieren worden blootgesteld aan de verschillende waarden van een gegeven experimentele behandeling. M.a.w. in bijlage 1 worden dezelfde dieren blootgesteld aan verschillende omgevingstemperaturen, etc; en ook in de proeven beschreven in bijlage 2 worden dezelfde dieren onderworpen aan verschillende duren van slaapdeprivatie; en in de proeven beschreven in bijlage 3 worden dezelfde dieren blootgesteld aan verschillende "work loads". In dat opzicht wordt met deze opzet het proefdiergebruik al geminimaliseerd.

Voor wat betreft de relatie tussen proeven is er 1 concreet go/no-go beslismoment, namelijk bij de aanvang van experimenten beschreven in bijlage 4 "collection of brain material". Als de experimenten beschreven in bijlage 2 en 3 bij één of meerdere van de gekozen diersoorten géén duidelijke homeostatische compensatie slaap of "sleep rebound" laat zien na slaapdeprivatie, dan lijkt het meten van slaapdeprivatie-gerelateerde

veranderingen in het brein geen logisch vervolg en zal daarvan worden afgezien. Alle andere proeven zijn onafhankelijk van elkaar waardevol en dragen allen bij aan een gedetailleerd beeld van slaapregulatie en slaaphomeostase bij de 3 gekozen diersoorten. De experimenten beschreven in bijlage 1 “sleep under different environmental conditions” en de experimenten in bijlage 2 “sleep deprivation of different durations” zullen verschillende belangrijke aspecten van slaapregulatie en slaaphomeostase in kaart brengen die niet noodzakelijkerwijs afhankelijk zijn. Evenzo, is het effect van eenmalige, kortdurende slaapdeprivatie in de experimenten met spreuwen beschreven in bijlage 2 niet noodzakelijkerwijs een goede voorspeller van de veranderingen die optreden bij de chronische slaapverstoring beschreven in bijlage 3. Dit laatste kan andere en/of cumulatieve effecten hebben op slaap die niet zichtbaar zijn bij een enkele kortdurende slaapdeprivatie. Bovendien suggereert ons eerder werk dat chronische slaapverstoring ook geleidelijke veranderingen in het brein te weeg kan brengen, bij ratten, die niet optreden bij eenmalige kortdurende slaapdeprivatie (zie bijv. Roman et al. Sleep 2005; Novati et al. Sleep 2008).

Vraag 2: U schrijft in uw aanvraag tupaia, spreuwen en kauwen te willen gebruiken. Het is voor ons niet duidelijk op welk moment van de dag worden de testen uitgevoerd (24 uur, alleen over dag/'s nachts). Vooral in het geval van slaaptekort is het belangrijk in het kader van haalbaarheid van de doelstelling om te weten of de dieren doorlopend gemonitord zijn, en of het slaaptekort over dag en 's nachts plaatsvindt en wordt getest. Aangezien uw onderzoek gericht is op slaap patronen en homeostase, kan het moment van het testen van de dieren een grote invloed hebben op de resultaten. We verzoeken u om dit punt uit te werken.

Ik veronderstel dat de CCD met ‘testen’ bedoelt de experimentele slaapdeprivatie en/of de EEG/EMG metingen om het slaap-waak patroon vast te stellen. Voor wat betreft de EEG/EMG slaap-waak metingen zal dit in alle experimenten een continue registratie zijn met een sample frequentie van minimaal 100 Hz. Dat wil zeggen, er worden doorlopend 100 EEG en EMG voltages per seconde gemeten en opgeslagen. In het geval van de experimenten met korte slaap deprivatie (bijlage volgnummer 2 “sleep deprivation of different durations”: tupaia, spreeuw, kauw) zal deze continue registratie telkens minimaal 3-4 dagen duren, vanaf ruim voor de experimentele slaapdeprivatie (baseline dag) tot ruim na de experimentele slaapdeprivatie (experimentele dag inclusief slaap deprivatie +1 of 2 recovery dagen voor het vastleggen van de slaap rebound). In het geval van experimenten met chronische slaapverstoring/slaaprestrictie (bijlage volgnummer 3 “working for food”: spreeuw) zal deze continue registratie de laatste 3 dagen van de 10-dagen durende manipulatie plaatsvinden.

Voor wat betreft de experimentele slaapdeprivatie zelf, deze zal in het geval van de experimenten met korte slaapdeprivatie plaatsvinden in de rustfase of slaapfase van de dieren, hetgeen bij deze dag-actieve soorten de donkerfase is. Verschillende dieren van slaapdeprivatie (bijv. 3h of 6h) zullen telkens aanvangen aan het begin van de donkerfase/slaapfase. Dit zal dan volgens standaard protocol gebeuren bij rood licht of dim licht, zoals ook in onze voorgaande studie aan de tupaia (Coolen et al., Sleep 2012). Uiteraard zal er alleen bij slaapdeprivatie in de normale slaapfase een duidelijke homeostatische compensatie-respons te verwachten zijn. In het geval van de chronische slaapverstoring d.m.v. "working for food" bij spreeuwen wordt de wakkerfase de dieren verlengd door een verhoging van de "work load". Met andere woorden, de dieren werken tijdens de normale wakker-fase / actieve fase voor hun voedsel, maar naarmate de "work load" hoger wordt zal er aan het eind van de dag meer tijd van de rustfase afgaan. De (dim-)lichtperiode wordt indien nodig verlengd. Aldus, net als bij de experimenten met kortdurende slaapdeprivatie beschreven in bijlage 2 wordt ook in dit geval het begin van de rustfase in meer of mindere mate verstoord, maar dan op dagelijkse basis.

Vragen van CCD over projectaanvraag AVD105002015359 d.d. 21 jan 2016

Vraag 1: Waarom is het gekozen om de proeven met wilde kauwen uit te voeren?

Indien dieren uit het wild in proeven worden gebruikt, is er een onderbouwde motivatie vereist.

Er is gekozen om de proeven uit te voeren met wildvang omdat wij momenteel niet beschikken over dieren in gevangenschap. Er worden weliswaar mondjesmaat kauwen te koop aangeboden door hobbyisten maar de oorsprong, kweekcondities en opgroeicondities daarvan zijn meestal onduidelijk. Dat is daarom voor ons geen optie want wij willen slaap-waak gedrag en slaaphomeostase in kaart brengen bij kauwen die daadwerkelijk representatief zijn voor de soort. Belangrijk gegeven is verder dat wildvang door ons gedaan kan worden met minimaal ongerief. Het woord wildvang behoeft in dit kader enige uitleg. Een van de samenwerkende partners en co-supervisors in het beschreven project, [REDACTED], heeft al vele jaren een uiterst succesvolle onderzoekslijn lopen aan gedrag en ecologie van kauwen (zie enkele recente publicaties hieronder). Hij heeft hiervoor momenteel zo'n 100 nestkasten uitstaan in 6 regionale kauwenpopulaties. Hierdoor is niet alleen alle benodigde kennis en ervaring aanwezig om het onderzoek aan kauwen in goede banen te leiden, maar ook het vangen van de dieren is door de aanwezigheid van de nestkasten een eenvoudige procedure met minimaal ongerief (zie vraag 2).

Vraag 2: Hoe worden de wilde vogels gevangen en is het ongerief van het vangen meegerekend in de inschatting van het ongerief in uw aanvraag? Indien dieren uit het wild in proeven worden gebruikt is de aanwezigheid van deze informatie vereist.

Voor de beschreven studie zullen jongen kauwen vlak voor het uitvliegen uit de nestkast worden gehaald. Er worden hierbij nooit meer dan 2 jongen uit hetzelfde nest weggenomen. Omdat de jongen voor het uitvliegen van het nest worden gehaald wanneer ze nog niet echt in het wild hebben geleefd en omdat ze direct worden overgebracht naar de semi-natuurlijke volieres van ons instituut zal de hele procedure slechts minimaal ongerief opleveren. De jongen zijn op dat moment in staat om zelfstandig te eten en in de volieres zijn voer en water ad lib aanwezig.

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,
9713 AV GRONINGEN



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD105002015359
Bijlagen
1

02 FEB. 2016

Datum

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 23 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Comparative studies on the regulation of sleep and consequences of sleep loss" met aanvraagnummer AVD105002015359. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 19 januari en 25 januari 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft gereageerd op de door de CCD gestelde vragen m.b.t. de go/no-go momenten en de tijdstip waarop de dieren getest worden, en u heeft uw keuze om wilde kauwen te gebruiken onderbouwd.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij geldt de algemene voorwaarde zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "Comparative studies on the regulation of sleep and consequences of sleep loss" starten. De vergunning wordt afgegeven van 2 februari 2016 tot en met 1 november 2020. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 23 december 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Op 14 januari 2016 heeft de DEC haar advies aangevuld met de antwoorden van de aanvrager op de door de DEC gestelde vragen.

Wij nemen het advies van de Dierexperimentecommissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Met het oog op artikel 10a1 van de wet 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
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: Rijksuniversiteit Groningen

Adres: A. Deusinglaan 1

Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN

Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 2 februari 2016 tot en met 1 november 2020, voor het project "Comparative studies on the regulation of sleep and consequences of sleep loss" met aanvraagnummer AVD105002015359, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is

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 24 december 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 24 december 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 23 december 2015, ontvangen op 24 december 2015, en aangevuld op 14 januari 2016
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 19 januari 2016 en op 25 januari 2016

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Assessment of sleep-wake patterns and sleep architecture under different environmental conditions	Andere zoogdieren (andere Mammalia) / Tupaia (Tupaia belangeri)	20	Matig / moderate	Beide geslachten worden gebruikt.
Assessment of sleep-wake patterns and sleep architecture under different environmental conditions	Andere vogels (andere Aves) / 20 spreeuwen en 20 kauwen	40	Matig / moderate	Beide geslachten worden gebruikt.
Assessment of sleep-homeostatic response to sleep deprivation of different durations	Andere zoogdieren (andere Mammalia) / Tupaia	20	Matig / moderate	Beide geslachten worden gebruikt.
Assessment of sleep-homeostatic response to sleep deprivation of different durations	Andere vogels (andere Aves) / 20 spreeuwen en 20 kauwen	40	Matig / moderate	Beide geslachten worden gebruikt.
Assessment of sleep under conditions of working for food	Andere vogels (andere Aves) / Spreeuwen	20	Matig / moderate	Beide geslachten.
Collection of brain material after different durations of sleep deprivation and subsequent recovery sleep	Andere zoogdieren (andere Mammalia) / Tupaia	80	Licht / mild	Beide geslachten worden gebruikt.
Collection of brain material after different durations of sleep deprivation and subsequent recovery sleep	Andere vogels (andere Aves) / Spreeuwen	160	Licht / mild	Beide geslachten worden gebruikt.

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.

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.

Wilde dieren

Het vangen van wilde dieren moet volgens artikel 10f van de wet door een deskundig persoon gedaan worden waarbij dieren zo min mogelijk pijn, lijden, angst of blijvende schade ondervinden. Gewonde dieren moeten onderzocht worden en behandeld, tenzij er een wetenschappelijke motivering is om niet te behandelen.

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van het Ethisch Toetsingskader en de bijbehorende toelichting waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: (Intern RUG code **9003**)
2. Titel van het project: **Comparative studies on the regulation of sleep and the consequences of sleep loss**
3. Titel van de NTS: **Vergelijkende studies aan de regulatie van slaap en gevolgen van slaaptekort.**
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning**
5. Contactgegevens DEC: -
 - naam DEC : [REDACTED]
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - mailadres contactpersoon : [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: **09-09-2015**
 - aanvraag complete: **09-09-2015**
 - in vergadering besproken: **17-09-2015**
 - anderszins behandeld: **30-11-2015**
 - termijnonderbreking(en) van / tot: **18-09-2015 tot 27-11-2015**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen. **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag: **27-11-2015**
 - advies aan CCD: **23-12-2015**
7. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen

- Strekking van het (de) antwoord(en)
- Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **18-09-2015**
- Strekking van de vraag / vragen:

Vragen t.a.v. de projectbeschrijving

De onderliggende redenen voor de keuzen voor de diersoorten lijkt ingegeven door lokale beschikbaarheid. Vanuit een vergelijkend standpunt is dit niet *per se* overtuigend, want daarvoor moet helder zijn welke specifieke vraag met welke soort het best te beantwoorden is. Twee vogelsoorten zeggen niet *per se* iets over vogels als geheel (wat is hun fylogenetisch relatie?). Dat de kauw slim is, is helder, maar waarom die dan geschikt is voor dit onderzoek niet. Tenzij in een later stadium de relatie tussen slimheid en slaapdeprivatie nader bekeken wordt. Bovendien stelt u zelf dat per soort bijzondere aanpassingen kunnen plaatsvinden (getuned naar lokale ecologische omstandigheden). Kunt u de keuzes voor de diersoorten specifieker onderbouwen?

Zijn de data van ratten en muizen op zich vergelijkbaar? Want als die al verschillen is de tegenstelling met nacht-actieve *rodents* niet helemaal juist. En zijn daar stamverschillen gevonden die al iets meer vertellen over regulatie en functie?

Vragen t.a.v. de bijlages

De dieren in het experiment worden solitair gehouden tijdens de metingen: wat zijn de effecten daarvan? Hoe worden de mogelijk negatieve effecten, als die er zijn, geminimaliseerd?

Er wordt gesuggereerd dat sociale huisvesting een effect heeft op slaap. Wat dan? En hoe relateert dit aan generaliseerbaarheid naar bijvoorbeeld mensen, die toch sociaal leven?

Worden beide seksen gebruikt?

Hoe veranderen laboratorium condities slaap-waak ritmes en wat zeggen die mogelijke veranderingen dan over de beoogde vergelijkbaarheid van soorten? Dit is van belang voor met name de relatie naar de kauw: zijn dit wildvang dieren (aanvraag suggereert dit)? Hoe lang worden die gehabitueerd aan de nieuwe situatie?

Zijn er *a priori* hypothesen te formuleren over de veranderingen in de hersenen?

Het verhogen van de *workload* als een manier om slaapdeprivatie te induceren: in hoever zijn de waargenomen effecten op het EEG/EMG specifiek voor chronische slaapdeprivatie en niet voor metabole of andere aanpassingen? Zijn er geen controles hiervoor nodig?

- Datum antwoord: **27-11-2015**

Strekking van het (de) antwoord(en): De gevraagde verduidelijkingen zijn verwerkt in het projectvoorstel en de bijlages. De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) **n.v.t.**

- Aard expertise
- Deskundigheid expert

- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Expert advies

10. Advies van IvD

- Datum advies IvD: **17-09-2015**
- Strekking advies IvD (*zie opmerking toelichtingsdocument*)

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.

Ja, het project is vergunningplichtig

Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies

2. **De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.**
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja**
4. Zijn DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies? **Nee.**

C. Beoordeling (inhoud):

1. Is de aanvraag een toetsbare eenheid? Leg uit waarom wel/niet. Geef hierbij ook aan of 1) de aanvraag als programma of project getypeerd wordt (Een programma omvat meerdere projecten en heeft een hoger gelegen doel, terwijl een project een concrete onderzoeksvraag heeft met in principe één concrete doelstelling en een helder geformuleerd resultaat), 2) het project coherent is, waarbij alle dierexperimenten logisch samenhangen en nodig zijn om het beoogde concrete resultaat te bereiken en 3) alle stappen in het project voldoende zijn uitgewerkt en geen onzekerheden bevatten, die voor de ethische toetsing relevant zouden kunnen zijn.

Ja, de aanvraag kan als een toetsbare eenheid worden beschouwd:

het gaat om onderzoek aan drie diersoorten die als samenhangend doel hebben slaap in andere dan rodent species te begrijpen en daarmee kennis te vergroten over slaap *per se* en de extrapoleerbaarheid van gegevens. De aanvraag heeft het karakter van een project waarin drie afzonderlijke en goed beschreven onderzoeksvragen in drie diersoorten tezamen een beeld geven van slaap. (zie opmerking toelichtingsdocument)

2. Zijn er aspecten in deze aanvraag die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod, zoals bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren? Indien van toepassing, leg uit waarom.

Nee

3. Is/zijn de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en)?

JA

Belangen en waarden

4. Wat is het motiverende doel van het project? (Zie ETK, Doeleinden project pag. 2).

Het betreft fundamenteel onderzoek.

5. Wat is het effect van het onderzoek op het welzijn van mens, dier en omgeving en wetenschappelijke kennis (zie tabel 1 van het ETK)?

Het project beoogt wetenschappelijk kennis over slaap te vergroten wat uiteindelijk ook toepasbaar kan zijn voor het beter begrijpen van slaap bij mensen

6. Worden de belangen van dieren, consumenten, burgers en omgeving (in termen van waarden) voldoende beschreven of zijn er overige belangen die voor de toetsing relevant zijn (zie tabel 2 van het ETK)? Specificeer de belangrijkste belanghebbenden (kwalitatief en kwantitatief).

Ja, er wordt voldoende beschreven waarom dieren worden gebruikt en hoe het welzijn van de dieren wordt geborgd en ongerief/pijn wordt voorkomen. (zie opmerking toelichtingsdocument)

7. Benoem de waarden die in het geding zijn voor de belangrijkste belanghebbenden.

Proefdieren: welzijn, autonomie en rechtvaardigheid

Onderzoekers: autonomie

8. Is er sprake van belangwekkende milieueffecten? Zo ja, leg uit waarom.

NEE

Proefopzet en haalbaarheid

9. Is het project goed opgezet? Leg uit waarom wel/niet.

Ja, de experimenten volgen de in slaaponderzoek gangbare manieren en technieken.

10. Zijn kennis en kunde van onderzoekers en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd? Licht toe waar dit uit blijkt?

Ja, de onderzoekers en (bio)technici hebben een trackrecord in dit slaaponderzoek. Nieuwe medewerkers worden door bekwame personen opgeleid.

11. Kan de gekozen strategie en experimentele aanpak leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project (*Zie ETK, Haalbaarheid pag. 4*)? Leg uit waarom wel/niet.

Ja, op deze wijze zal kennis over slaap en extrapoleerbaarheid worden verkregen.

Welzijn dieren

12. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Geef aan of en waarom de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk onderbouwd is.

De onderzoekers gebruiken tree-shrews, spreeuwen en kauwen. Ten aanzien van de kauwen is goed beschreven wat de reden is voor de keuze van deze soort. De spreeuw is wildvang. (zie opmerking toelichtingsdocument)

Hieronder de tabel bijzonderheden

- Bedreigde diersoort(en) (10.e.4)
- Niet-menselijke primaten (10.e)
- Dieren in/uit het wild (10.f)**
- Gefokt voor dierproeven (11)
- Zwerfdieren (10.h)
- Hergebruik (1.e.2)
- Huisvesting en verzorging
- Locatie: instelling vergunninghouder (10.g)
- Toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)

- Dodingsmethode (13.c.3)

13. Is de kwaliteit van de huisvesting en verzorging volgens bijlage III van de richtlijn? Wordt de kwaliteit van de huisvesting en verzorging, indien afwijkend van bijlage III, voldoende geborgd? Leg uit waarom wel/niet.

De dieren worden gehuisvest volgens de richtlijnen. (zie opmerking toelichtingsdocument)

14. Is het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch ingeschat en geclassificeerd? Leg uit waarom wel/niet.

Ja, dit is realistisch ingeschat.

15. Is er sprake van integriteitsaantasting? Leg uit waarom wel/niet (Zie ETK, Waarden, pag. 4).

Ja. Als een dierproef meer dan een injectie door een dierenarts behelst is per definitie de integriteit (van in ieder geval weefsels) aangetast. *(zie opmerking toelichtingsdocument)*

3V's

17. Heeft de aanvrager een overzicht gegeven van alle potentiële vervangingsalternatieven en heeft de aanvrager daar een gemotiveerde keuze in gemaakt? Onderschrijft de DEC deze keuze? Leg uit waarom wel/niet *(Zie ETK, subsidiariteit, pag. 4)*.

Ja, slaap onderzoek kan alleen in levende organismen worden gedaan *(zie opmerking toelichtingsdocument)*

18. Is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat? Is er een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Leg uit waarom wel/niet *(Zie ETK, subsidiariteit, pag. 4)*.

Ja, het aantal dieren is beperkt tot wat wetenschappelijk kan worden verantwoord. *(zie opmerking toelichtingsdocument)*

19. Is het project in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en is het project zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd? Leg uit waarom wel/niet *(Zie ETK, subsidiariteit, pag. 4)*.

Ja, experimenten worden zodanig gedaan dat ongerief tot een minimum wordt beperkt.

20. Zijn er redenen om aan te nemen dat, bij wettelijk vereist onderzoek, duplicatie plaats vindt? Zo ja, licht dit toe.

a. Beschikt de aanvrager over voldoende expertise en informatie om tijdens het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt? Leg uit waarom wel/niet.

NVT

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

21. Worden dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet? Zo nee, is daarvoor een actuele wetenschappelijke onderbouwing? Welke maatregelen zijn verder getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken (*Zie ETK, proportionaliteit en voorzorg, pag. 4*)?

Ja, beide seksen worden gebruikt.

22. Worden dieren gedood in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef)? Is dit noodzakelijk en wordt een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt (*Zie ETK, proportionaliteit en voorzorg, pag. 3*)? Licht dit toe.

Ja, er worden moleculaire analyses gedaan op hersenstructuren. Hiertoe worden de daartoe geëigende en geschikte dodingsmethoden gebruikt.

23. Indien dieren worden gedood, is adoptie of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is (*Zie ETK, proportionaliteit en voorzorg, pag. 3*).

Dit is niet mogelijk ivm analyses (zie boven)

NTS

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

JA

D. Ethische afweging

1. Benoemen de centraal morele vraag (*Zie ETK, Probleem definiëren, pag. 9*).

Het verkrijgen van meer kennis over slaap rechtvaardigt het gebruik van dieren en het mogelijk ongerief dat wordt aangedaan

2. Weeg voor de ethische afweging de waarden van de verschillende belanghebbenden zoals beschreven in C ten opzichte van elkaar af. Onderbouw dit met moreel relevante feiten (*Zie ETK, Waarden, pag. 4 en Weging moreel relevante argumenten, pag. 11*).

Autonomie van onderzoek aan de kant van de onderzoeker; welzijn, autonomie en rechtvaardigheid aan de kant van het dier.

3. Beantwoord de centraal morele vraag, gebruik makend van bovenstaande afweging. Motiveer de afweging, zodanig dat deze navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel.

Onderzoek naar slaap buiten de mens als proefpersoon en buiten rodents die veel gebruikt zijn, is nodig om de functie en evolutie van slaap in brede zin te begrijpen. Onderzoek aan slaap bij mensen is zeer beperkt in zijn mogelijkheden van het begrijpen van moleculaire processen onderliggend/gekoppeld aan slaap. Het gebruik van de diersoorten zoals hier benoemd is daarom te rechtvaardigen. Hoewel de dieren worden geschaad in hun belangen (immers ze ervaren bijvoorbeeld ongerief door de procedures) is dit door de onderzoekers beperkt en weegt dit op tegen het belang van het onderzoek.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus of op een meerderheids-minderheidsstandpunt. Specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie ETK, Advies pag. 12*).

CONCENSUS

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie ETK, Proportionaliteit en voorzorg pag. 3, Subsidiariteit pag. 4, Dilemma's pag. 8 en Advies pag. 12*).

Indien van toepassing zullen dergelijke aspecten onder D3 worden verwerkt.

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 2 februari 2016 9:43
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Beschikking AVD105002015359
Bijlagen: Beschikking 359.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 15:02
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: terugkoppeling besluit op aanvraag AVD105002015359

Geachte DEC,

Enige tijd geleden heeft u advies uitgebracht op een aanvraag voor een projectvergunning met titel 'Comparative studies on the regulation of sleep and the consequences of sleep loss' en aanvraagnummer AVD105002015359, uw kenmerk: 9003. Op 14 januari 2016 heeft u uw advies aangevuld met het antwoord van de aanvrager op uw vragen. Wij danken u voor uw advies, en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug.

De CCD heeft nog de volgende vragen aan de aanvrager gesteld:

- In het projectvoorstel bijlage van uw aanvraag beschrijft u verschillende proeven met tupaia, spreeuwen en kauwen. 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 tupaia, spreeuwen en kauwen te willen gebruiken. Het is voor ons niet duidelijk op welk moment van de dag worden de testen uitgevoerd (24 uur, alleen over dag/'s nachts). Vooral in het geval van slaapttekort is het belangrijk in het kader van haalbaarheid van de doelstelling om te weten of de dieren doorlopend gemonitord zijn, en of het slaapttekort over dag en 's nachts plaatsvindt en wordt getest. Aangezien uw onderzoek gericht is op slaap patronen en homeostase, kan het moment van het testen van de dieren een grote invloed hebben op de resultaten. We verzoeken u om dit punt uit te werken.
- Waarom is het gekozen om de proeven met wilde kauwen uit te voeren? Indien dieren uit het wild in proeven worden gebruikt, is er een onderbouwde motivatie vereist.
- Hoe worden de wilde vogels gevangen en is het ongerief van het vangen meegerekend in de inschatting van het ongerief in uw aanvraag? Indien dieren uit het wild in proeven worden gebruikt is de aanwezigheid van deze informatie vereist.

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
	NTS2016403								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x		x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			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	Mail vragen antwoorden DEC 8-2-2016				x		x	x	
10	Advies CCD		x						x
11	Beschikking en vergunning				x		x	x	
12	Mail beschikking 29-2-2016				x		x	x	
13	Mail terugkoppeling DEC 29-2-2016				x		x	x	

26 JAN. 2016

AVD 103002016403

1



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 10300
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9

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	Geert Groteplein 10
Postbus	9101 [Redacted]
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen
IBAN	NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud

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 (Optioneel) 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 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 0 1 _ 0 4 _ 2 0 1 6
- Einddatum 0 1 _ 0 4 _ 2 0 2 1
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Drug development for malaria
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Geneesmiddelenontwikkeling voor malaria
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.441,00 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
- DEC-advies, factuurinformatie

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.

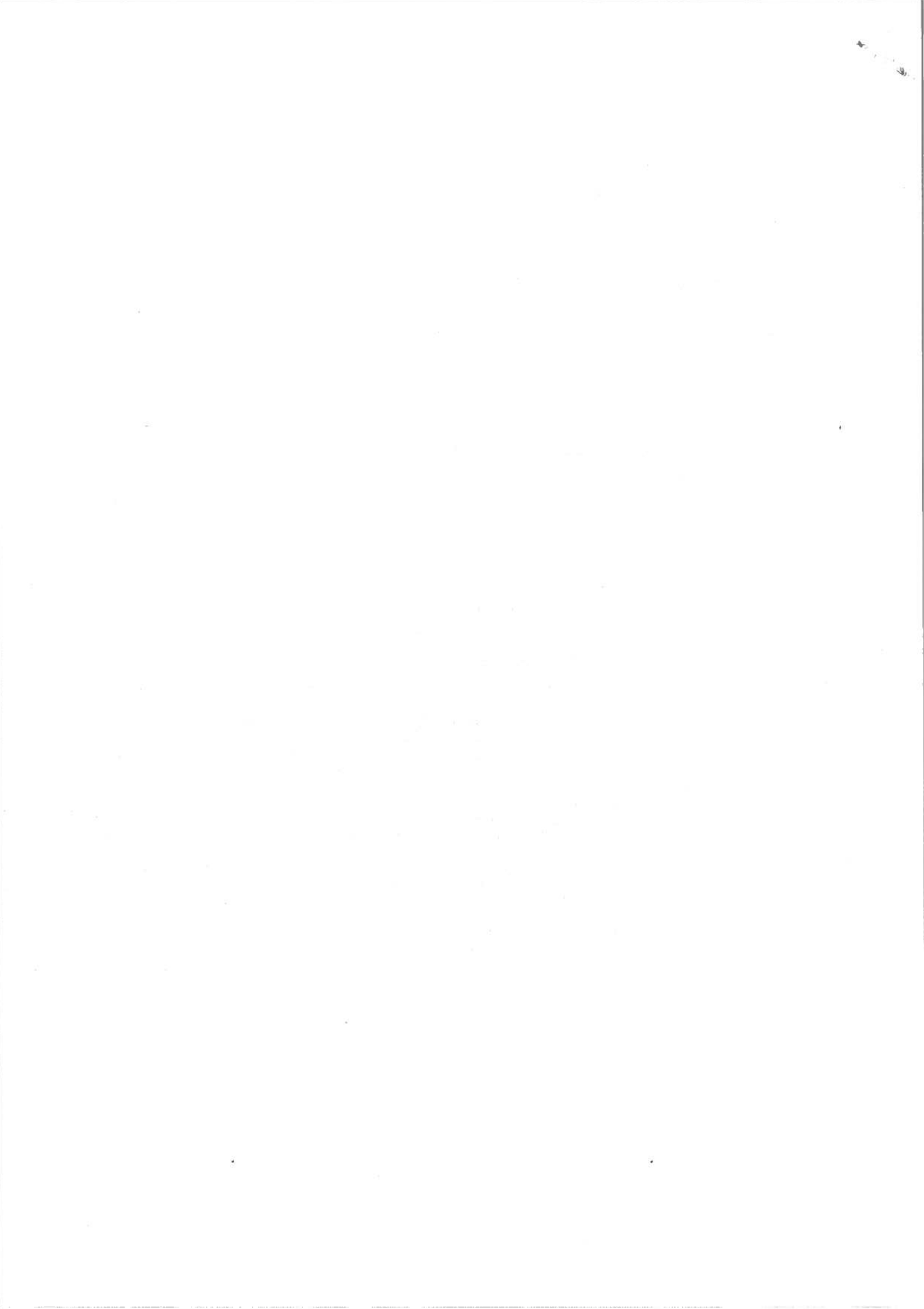
Naam 

Functie 

Plaats Nijmegen

Datum 22 - 01 - 2016

Handtekening 



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal of 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'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Drug development for malaria |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|--|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input type="checkbox"/> Basic Research
<input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research
<input type="checkbox"/> Regulatory use or routine production
<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
<input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures
<input type="checkbox"/> 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 background

Malaria is one of the most devastating infectious diseases worldwide, caused by infection with parasites of the genus *Plasmodium*. Despite all the progress that has been made in reducing the malaria-threat, in 2013 there were still ~200 million cases and ~0.6 million deaths, particularly of children less than five years of age [1]. In addition to the tremendous human suffering, this disease forms a profound economic burden for the affected countries, which are already struggling with poverty. Dwindling effectiveness of all currently registered anti-malarials due to fast emergence and spread of resistance and the absence of an effective vaccine further emphasize the urgency of the situation. There are a number of factors that contribute to the complexity of the problem such as the complicate life cycle of the parasite, the occurrence of six *Plasmodium* species that infect humans, and the ability of the parasite to evade the human immune system.

The study of *P. falciparum* the most important human parasite, is largely restricted to *in vitro* cultures. The cultures do not capture the full life cycle of the parasite, and do not incorporate drug absorption, distribution, metabolism and excretion processes that have a large impact on drug efficacy. For this reason, mouse models for malaria are extremely important to study parasite biology and to test antimalarial drugs. The most commonly used infections of rodents are *P. berghei*, *P. yoelii*, and *P. chabaudi*. These models allow the study of *in vivo* infections as well as the complete *Plasmodium* life cycle. Furthermore, *P. berghei* and *P. yoelii* provide straightforward and efficient experimental genetics approaches ████ Comparative *Plasmodium* genome analyses have validated the use of such model species, particularly for studying basic parasite biology [3-6].

Current chemotherapeutics for malaria

Uncomplicated malaria may be treated with oral medications. The most effective treatment for *P. falciparum* infections is the use of artemisinins in combination with other antimalarials (known as artemisinin-combination therapy, or ACT), which decreases resistance to any single drug component. These additional antimalarials include: amodiaquine, lumefantrine, mefloquine or sulfadoxine/pyrimethamine. Another recommended combination is

dihydroartemisinin and piperaquine. ACT is about 90% effective when used to treat uncomplicated malaria. Recommended treatment for severe malaria is the intravenous use of antimalarial drugs.

Development of drug resistance

Control of *P. falciparum* malaria relies strongly on chemotherapy but is severely compromised by emerging resistance to all known antimalarial drugs [7]. Malaria strains found on the Cambodia–Thailand border are resistant to combination therapies that include artemisinins and may therefore be untreatable. Exposure of the parasite population to artemisinin monotherapies in subtherapeutic doses for over 30 years and the availability of substandard artemisinins likely drove the selection of the resistant phenotype. Resistance to artemisinin has been detected in Cambodia, Myanmar, Thailand, and Vietnam and there has been emerging resistance in Laos.

Clinical development of antimalarials has been slow and new chemical classes of compounds have not been introduced since 1996. The existing portfolio targets primarily asexual forms responsible for clinical disease but not the sexual forms responsible for transmission to the mosquito vector and spread of the parasite in the population. The latter is critical for malaria eradication strategies.

Previous work on antimalaria drug development

[REDACTED] as a potential new class of anti-malarials. These [REDACTED] kill *Plasmodium* parasites *in vivo* in rodent models but also block transmission of *P. falciparum* to mosquitoes [REDACTED]. The presumed target is the poorly understood [REDACTED] which is different from the canonical pathway. [REDACTED]

[REDACTED] Continued fundamental studies of the gene/protein functions in the target pathways will provide the fundamental basis for the continued clinical development of potential novel anti-malarials that target both asexual and transmission stages. [REDACTED]

[REDACTED] The current project application covers important animal studies (rat and mice) that use rodent malaria parasites as a model system.

References

1. World Health Organization. *World Malaria Report 2014*. (2014). [REDACTED]
3. Hall, N. *et al.* A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science* **307**, 82–86 (2005). [REDACTED]
5. Carlton, J. M. *et al.* Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature* **455**, 757–763 (2008).

6. Pain, A. *et al.* The genome of the simian and human malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *Nature* **455**, 799–803 (2008).
7. Burrows JN, van Huijsduijnen RH, Mohrle JJ, Oeuvray C, Wells TN. Designing the next generation of medicines for malaria control and eradication. *Malar J.* 2013;12:187.

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 overall aim of the project is to develop new, effective, safe, and cheap antimalaria drugs, with transmission blocking activity. We largely strive for the target product profile stated by the MMV, which includes single exposure, fast and radical cure, targeting asexual and sexual stages, shelf life > 2 years and cost of < \$1 per treatment.

We think that these ambitions are timely and achievable. The institute is home to excellent, state-of-the-art core facilities, including "omics", advanced microscopy, and flow-cytometry platforms. All animal experiments will be performed at the Central Animal Facility (CDL) and CDL personnel will be involved in all the experiments and the animal care-taking. Some of the senior and most experienced team members, with years of expertise and dedication, will be involved with the full breadth of the project and will maintain the overview ensuring that significant progress will be made through prioritizing promising tracks and abandoning "dead-ends". The project will be discussed and evaluated at regular meetings of the entire (local) team and by the (international) MMV board.

The project is well funded. The proposed objectives are achievable within the time frame of the project.

3.3 Relevance

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

The medical and societal relevance of effective, safe and affordable malaria drugs is evident as malaria is the most prevalent infectious disease, and particularly affects small children in developing countries. The increasing emergence of resistance against current antimalarials, and the paucity of new antimalarials in the pipelines of pharmaceutical industries put further pressure on the need to identify new targets and develop new drugs.

3.4 Research Strategy

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

Overall strategy to achieve the objectives

Drug development, as a rule, has a number of phases, some of which include the use of experimental animals (see figure 1 for an overview of the activities). We obtained a number of lead compounds, which need to be optimized before they can enter the final preclinical phase and subsequent clinical phases. The overall strategy here is to perform efficacy studies of the lead compounds and to improve the compounds in subsequent rounds of medicinal chemistry. This is an iterative process, which includes studies on pharmacokinetics (PK), pharmacodynamics (PD), and mechanism of action (MoA) of the compounds. All these steps include the use of experimental animals. Prior to *in vivo* testing, molecules will be triaged on basis of physicochemical characteristics and activity in *in vitro* models for antiparasitic efficacy, target engagement, metabolic stability, and plasma protein binding. Only a small subset of molecules will proceed to *in vivo* testing (see figure 1).

In vivo efficacy studies are aimed at evaluation of clinical parameters, such as parasitemia, in animal models for malaria. PK parameters such as bioavailability and clearance of the drugs will be assessed in wild type control animals (mice and rats). This will drive the chemical synthesis (lead optimization) to generate compounds with more favourable PK profiles. PD and MoA studies will be performed *in vitro* and *in vivo*. PD and MoA studies will be performed both in wild type control animals and animal models for malaria, to obtain a more detailed insight in the physiological and biochemical actions of the drug at the level of the parasite and the host.

Sequence of experiments and go/no-go points

Drug development is an iterative process, where the combined outcome of *in vitro* assays and *in vivo* PK and efficacy studies guides the medicinal chemistry efforts (lead optimization). This may lead to improved compounds, which are again subjected to PK and efficacy studies (see figure 1).

In general there are a number of criteria that need to be met before development of a certain drug class is taken to the next step. These include:

- *In vitro* metabolic stability, toxicology, and PD data will be used as go/no-go criteria points for lead compounds before continued testing in animal is considered.
- Pharmacokinetics of promising lead compounds will be performed before *in vivo* efficacy tests in experimental animals will be undertaken. When *in vivo* levels are expected to be insufficient for clinical activity, based on extrapolation of *in vitro* data, medicinal chemistry efforts will be directed at improving PK of the compounds.

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.

General outline

Drug candidates will be optimized for clinical efficacy, PK and safety properties. This involves a cyclic process of medicinal chemistry (organic synthesis) and in vitro/in vivo testing of the compounds in various model systems. Mice are the preferred animal species in the model systems used here and are the gold standard for malaria drug research world-wide. The reason for this is that malaria infections in mice by *P.berghei* are similar to infections in humans by *P.falciparum*. Like humans, mice cannot control infection and the infection may be lethal when left untreated. The vast majority of publication on animal models for malaria is on mice. Although rats can also be infected by *P.berghei*, they tend to control the infection and only low levels of parasitemia are reached. For this reason, rats are not the preferred animal in most malaria drug studies. However, due to the nature of the compound class that we are developing [REDACTED] the drugs cannot always be adequately tested in mice because of the high plasma [REDACTED] levels [REDACTED] that may compete for some of the drugs at the level of transporters or target enzymes. For this subgroup of compounds we will use rats, which have a plasma [REDACTED] level that is similar to humans (1-2 micromolar). We cannot predict in advance what the percentage of compounds will be that show [REDACTED] competition. The numbers are based on the assumption that half of the compounds will be tested in rats and the other half in mice.

1. Pharmacokinetics of candidate drugs

Drug candidates are optimized for efficacy, pharmacokinetic and safety properties (see flow chart). This involves a process of organic synthesis and in vitro/in vivo testing. Drugs that are intended for systemic use will be studied for PK parameters by administration to rats or mice. This will be done p.o. and i.v. for determination of absorption, distribution, metabolism, excretion and bioavailability. Blood will be drawn at various intervals for analysis of drug levels and metabolites, using liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS). Animals will be sacrificed at the end of the experiment to collect blood and organs for PD and MoA studies. Although mice would in general be the preferred animal species for rodent malaria, some of the [REDACTED]-derivatives cannot be adequately tested in mice, as indicated above. For these compounds we need to use rats, which have a plasma [REDACTED] level that is similar to humans.

2. Efficacy studies of antimalarial drugs

Mice or rats (for motivation see above) will be infected with blood stage parasites (either wild type or genetically modified) to establish a blood-stage infection. Experimental drugs or established drugs will be administered to the animals in the drinking water, by oral gavage or by *i.v.*, *i.p.*, or *s.c.* injection, prior to or during an infection. Most commonly this will concern the application of drugs by oral gavage. Parasitaemia will be monitored by blood smears and quantitated by luminescence counts in blood, using a transgenic parasites that constitutively expresses the luciferase enzyme, and/or by daily blood. Parasitemia will not be allowed to continue above a certain threshold that causes severe discomfort to the animals. In such a case the experiment will be terminated. At the end of the experiment, animals will be sacrificed to collect blood and organs for further analysis.

3. Experimental animals for research tools and pilot studies

The [REDACTED] drugs target the [REDACTED] pathway, which is a five step synthesis starting with [REDACTED]. As part of our research strategy, we will perform experiments to identify which enzymes are targeted by the experimental drugs. Whenever possible, *in vitro*

biochemical and cell-based assays will be performed. These experiments require specific antibodies against parasite proteins as research tools, which are in general not available. For this reason, we will perform a limited number of immunizations of rabbits and guinea pigs according to standard protocols, to generate antisera against recombinant proteins of interest.

In some of the experiments, animal material is required to perform *in vitro* experiments that cannot be done with cell lines. These experiments include normal rat or mouse liver cells, which are cultured and used to test the effect of drugs on biotransformation and toxicity.

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

All components of the project are dependent on each other. Optimization of lead compounds is an iterative process involving medicinal chemistry, PK, and testing of compounds for efficacy and safety (see figure 1). PD and investigation of the mechanism of action follows are important aspects to guide medicinal chemistry efforts. Prior to *in vivo* efficacy testing, molecules will be triaged on basis of physicochemical characteristics and activity in *in vitro* models for, a.o., antiparasitic efficacy, target engagement, metabolic stability, and plasma protein binding. Development of certain compounds may be terminated at any stage based on an inability to meet these criteria.

Figure 1

Main objective: drug development for malaria

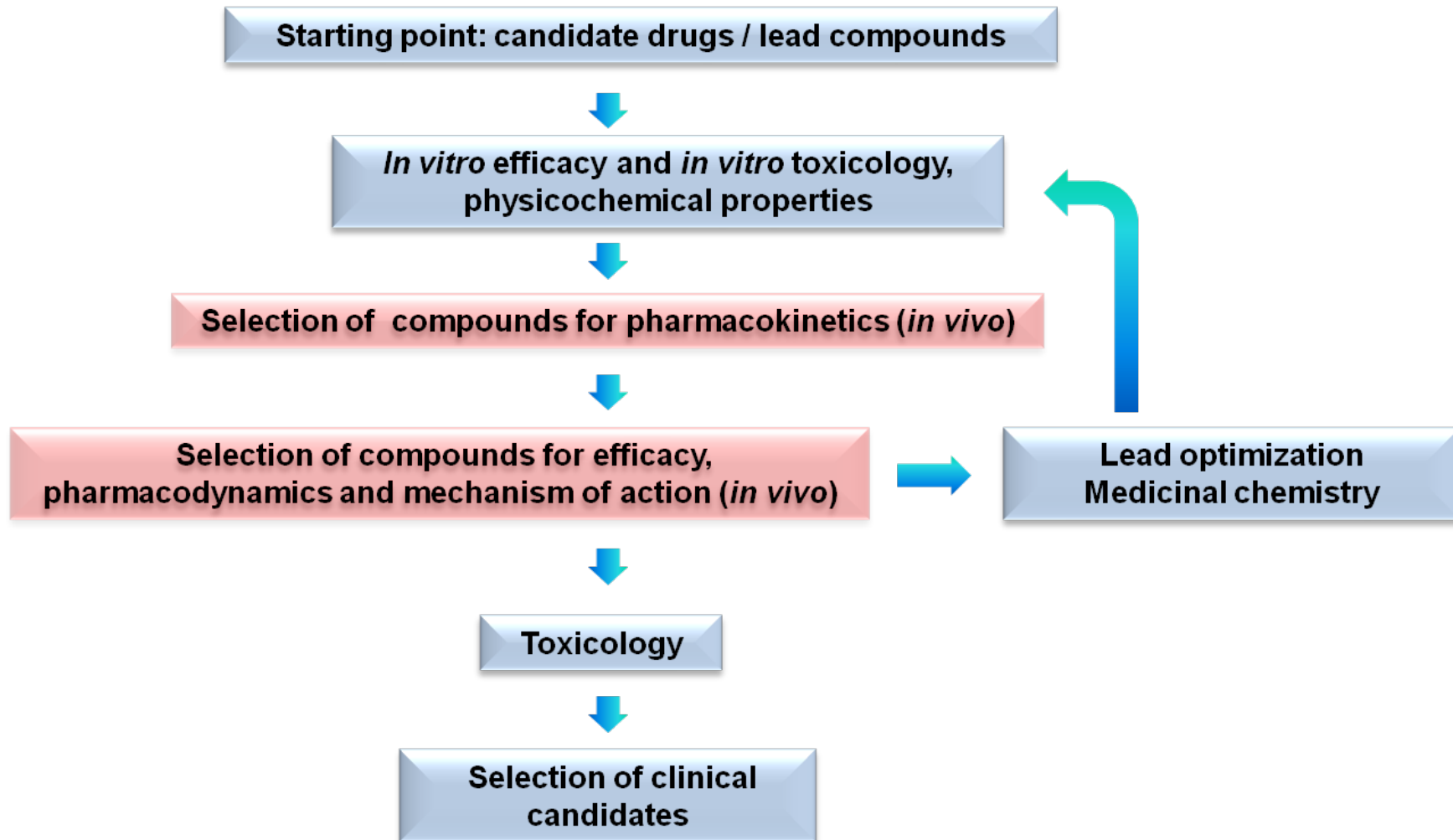


Figure 1: Flow chart of drug development. Red boxes indicate parts that involve experimental animals in the current project. Toxicology is not part of the project. Lead compounds with anti-malaria properties *in vitro* are investigated for PK properties (*in vivo*). Efficacy is evaluated by *in vivo* malaria models. Candidate compounds are subjected to multiple rounds of lead optimization until progression to the clinical phase.

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	Pharmacokinetics of antimalarial drugs
2	Efficacy studies of antimalarial drugs
3	Research tools

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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Pharmacokinetics of antimalarial drugs

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.

As outlined in the Proposal Background we are developing novel antimalarial chemotherapeutics of the [REDACTED]. These compounds are unique because they target both sexual and asexual stages. This animal procedure covers pharmacokinetics of these novel antimalarial compounds. Compounds will be administered to mice or rats to test adsorption, distribution, metabolism and excretion of the compounds according to standard procedures. Based on PK data, we will be able to estimate whether the compounds reach a sufficient level to expect an effect in an *in vivo* malaria model.

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

PK analysis of new compounds

Inbred C57BL/6 mice, Wistar rats or Brown Norway rats will receive single doses drugs by oral administration or by *i.v.* or *i.p.* injection. Just prior to administration of the compound and during a 24 hour period blood samples will be collected (maximum five times) via tail snip for LC-MS quantification of the compounds. At 24 hours after drug administration the animals will be sacrificed by terminal retro-orbital or intracardiac bleeding under adequate general anaesthesia and organs will be dissected for further analysis (histology, blood chemistry, qPCR). **The animals will be housed in conventional cages.**

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

Based on previous experiments we know that 3 animals per drug dosage will give adequate data to generate a time course of drug exposure.

B. The animals

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

We will use mice and rats from registered EU breeding companies. The choice of rats or mice is guided by the compound properties determined *in vitro*. All compounds that show competition with [REDACTED] will be tested in rats rather than mice, because of the [REDACTED] plasma levels in mice [REDACTED]. Rats are similar to humans in this respect [REDACTED]. A subset of compounds will be tested in both mice and rat in order to better understand the PK-PD relationship in relation to body volume and plasma [REDACTED] levels of the different species. We will use either sex depending on availability.

Based on previous experience, we hope to obtain a maximum of 10 new compounds each year to be tested for PK in mice and in rats. These may be completely novel chemical entities, or modifications of previous compounds that result from lead optimization. Each compound will be tested via 2 different dosage routes (p.o, i.v.) in 3 animals each. These are commonly used (minimal) numbers. In previous experiments, we found that the variance of the drug levels is sufficiently small to allow time courses on only 3 animals per dose.

3 animals x 2 routes x 10 compounds x 5 years = 300 mice and 300 rats for PK studies (maximum).

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
WT mice	Regular breeding	300	Young
WT rats	Regular breeding	300	Young

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

PK studies are by definition *in vivo* studies and cannot (yet) be replaced by *in vitro* studies.

Reduction

Each compound will be tested in 3 animals each per administration route. These are minimal numbers. In previous experiments, we found that the variance of the drug levels is sufficiently small to allow time courses on only 3 animals per dose.

Refinement

The number of blood samples has been reduced to the minimum number of 5 per experiment. The quantity of blood is minimal (100 µl).

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

- 1) Animal welfare will be monitored daily. The experiments will be performed by authorized and skilled personnel only. In order to minimize the risk of possible adverse effects resulting from the application of novel, putative anti-malarial compounds, all compounds are first tested in mammalian cell models for *in vitro* toxicology. Thus far, none of the compounds of the class that we tested showed adverse effects in animal studies.
- 2) There are no measurable adverse effects on the environment.

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.

Not applicable

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.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The animals will experience stress during the experimental procedures.

Explain why these effects may emerge.

The discomfort (stress) is caused by the experimental procedures, such as drug administration and the collection of blood samples.

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

Since the levels of discomfort result from the experimental procedures they cannot be prevented. The severity is minimized while the experiment will be performed by authorized and skilled personnel only.

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.

In general, we do not expect clinical features associated with the proposed PK experiments. However, as we are using new compounds that have not been tested before *in vivo*, adverse effects cannot be completely excluded. Distress/pain and abnormal behavior may be signs of an adverse drug effect and will serve as criteria for termination of the experiment.

Indicate the likely incidence.

Based on previous work and the low dosages required for PK, we think that the incidence will be low to negligible.

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).

The animals will experience moderate levels of discomfort due to the administration of the compounds and repeated collection of blood.

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.

At the end of the experiment, blood and organs will be collected for analysis as indicated above. Therefore, all animals will be sacrificed, either by terminal retro-orbital or intracardial bleeding under adequate general anaesthesia, or by cervical dislocation.

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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 2	Type of animal procedure Efficacy studies of antimalarial drugs

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.

As outlined in the Proposal Background we are developing novel chemotherapeutics for malaria. The applied methods all involve the administration of these compounds to mice or rats to test their *in vivo* properties such as anti-malarial activity and possible side effects. The rodent malaria infection models will allow us to test lead compounds that demonstrated promising anti-malarial activities *in vitro*. Ideally, such compounds would demonstrate activities against liver-stage, asexual blood-stage, and sexual blood-stage parasites, thus functioning as a prophylactic, curative, and transmission-blocking compound.

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

High dosage and dose-response screens in rodent malaria models

If PK properties are favourable, a rodent malaria model will be used to test the compounds for antimalarial activity. Mice or rats will be infected with parasites from frozen stocks, live transfers, or *in vitro* cultures and can be mosquito-derived sporozoites, which first migrate to the liver before establishing a blood-stage infection, or blood-stage parasites. Mice and rats can be infected with the same strains (e.g. *P.berghei* or *P.yoellii*) and all procedures are similar for mice and rats, with exception of parasite inoculums and drug dosing. The parasites will be administered by mechanical injection (typically *i.v.* or *i.p.*) or by natural bites from malaria parasite-infected mosquitoes under adequate general 30-min anaesthesia. Anti-malarial compounds will be administered orally or by *i.v.*, *i.p.*, or *s.c.* injection. To test prophylactic activity this will be done prior to a sporozoite infection. The testing of curing or transmission-blocking activities of the compounds will start following anywhere between one and seven days after the infection, but typically between three and five days after infection. A general treatment includes one to three administrations per day for a maximum of five successive days. In the first experiment, only a single dose will be tested at a high concentration. When we find compounds active at a high concentration, we will repeat the procedure described with different concentrations in order to find the lowest dose that is still efficient as an anti-malarial. All infections will be monitored through the collection of drops of tail blood, which may be analysed microscopically (e.g. through Giemsa-stained blood smears or by fluorescence microscopy), using flow-cytometry, or molecular techniques (e.g. PCR or sequencing). In a small proportion of mice (<5%), the *in vivo* liver load imaging system (IVIS) will be used to measure liver infection in anaesthetized animals (with a maximum of 2 measurements during 48 h). Based on the expected and observed course of infection, the frequency of collecting tail blood will be determined. During the final stages of the infection this is typically done on a daily basis, though specific experiments may require sampling twice

daily (for no more than 2 consecutive days). Besides the antimalarial activity of the compound to be tested, also some limited information of potential side effects of the compounds to the animals will be obtained. Up to eight days after start of the infection, the animals will be sacrificed, either by terminal retro-orbital or intracardial bleeding under adequate general anaesthesia, or by cervical dislocation. The organs will be dissected for further analysis. Blood will be analysed for clinical chemical parameters (e.g. glucose, electrolytes, liver and kidney function).

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

Drug testing experiments aim to have results with a significance of 0.05 and a power of 0.80. Here we assume that the proportion of success for the positive control is 0.99 and that the to-be-tested compounds can expect a proportion of success of 0.70. Other considerations regarding the reduction of animal numbers are extensively discussed in section D1: 3 R's. In summary, where appropriate we will employ state-of-the-art techniques that minimize animal use.

B. The animals

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

We will use mice and rats from EU registered breeders. In general, we will use the C57BL/6 mice, Wistar rats and Brown Norway rats as these are commonly used for rodent malaria models. The sex of the animals is not directly relevant to the experiments. We will use either sex depending on availability. The age of the animals used will be from 8 to 30 weeks.

Justification of the estimated maximum numbers of mice and rats

For the initial high dose screen for drug efficacy, we will use a maximum of 525 mice and 525 rats. Based on previous experience, we hope to obtain a maximum of 7 new compounds each year to be tested in the high dose screens for each animal species. These compounds are selected from the 10 compounds that were tested for PK. Each compound will be tested along positive and negative controls in 5 animals each.

(5 years × 7 compounds × [1 dosage + 2 controls] × 5 animals)

For the dose-response efficacy screen, we will use a maximum of 375 mice and 375 rats. We expect to test a maximum of 3 compounds per year, selected from the 7 compounds of the high dose screen. Each compound will be tested at 3 dosages along positive and negative controls in 5 animals each.

(5 years × 3 compounds × [3 dosages + 2 controls] × 5 animals)

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
---------	--------	---------------------------	------------

WT mice	Regular breeding	900	Young
WT rats	Regular breeding	900	Young

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

The aim of the proposed study is to establish the relationship between dose and efficacy (PK-PD relationship). As indicated above, pharmacokinetics cannot be mimicked *in vitro*. In addition, malaria parasites show complex parasite-host interaction, e.g. by sequestering in bone marrow and organs. These complexities cannot be fully mimicked *in vitro* making the rodent malaria model an indispensable tool for the characterization of new anti-malarials.

Reduction

The minimum required number of animals to measure an effect size for a given experiment will be determined by means of a thorough statistical analysis. We will first perform PK experiments to test whether the compounds have beneficial parameters to give *in vivo* efficiency in a rodent malaria model. Further, we choose to test potential new anti-malarials first at one high concentration so we will avoid using mice to test different

concentrations of compounds that lack efficiency at high concentrations. When combining experiments enables more efficient use of mice of rats, *e.g.* through the reduction of the number of control mice required, this will be done when technically feasible. Where appropriate, we will apply novel methods utilizing luminescent or fluorescent parasite lines and *in vivo* imaging systems (such as IVIS), which enable us to follow infections in time without sacrificing mice for each time-point.

Refinement

We are using the currently most refined malaria animal model, monitoring and visualizing the infection fast and accurately to minimize the risks of mice developing any clinical symptoms.

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

1) Animal welfare will be monitored daily. The experiments will be performed by authorized and skilled personnel only. The research team has years of experience and expertise with rodent malaria parasite infections. During the final stages of an infection, parasitaemia levels of the animals will be monitored daily. For certain critical experiments, special welfare forms will be kept and documented twice daily. The experiment will be terminated and the mouse sacrificed when it displays clinical symptoms or when parasitaemia has become too high (see humane endpoints for more details). In order to minimize the risk of possible adverse effects resulting from the application of novel, putative anti-malarial compounds, all compounds are first tested in mammalian cell models for *in vitro* toxicology. Thus far, none of the compounds of the class that we tested showed adverse effects in animal studies.

2) There are no measurable adverse effects on the environment.

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.

Not applicable

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.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The animals will experience some stress during the procedures.

Explain why these effects may emerge.

The discomfort (stress) is caused by the experimental procedures such as oral drug administration and the collection of blood samples.

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

Since the levels of discomfort result from the experimental procedures they cannot be prevented. The severity is minimized while the experiment will be performed by authorized and skilled personnel only.

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.

Well-being and parasitaemias of all infected mice and rats will be monitored and animals will be sacrificed at parasitaemias <10% before they can develop malaria-associated clinical symptoms, such as cerebral malaria and anaemia. In the unanticipated case that an animal does start to display clinical symptoms, the parasitaemia will be determined (if not already done so) and a careful assessment of the well-being of the animal will be performed using specific recommendations to monitor experimental cerebral malaria (Lackner *et al. Neuropathol Appl Neurobiol* 2006; Carroll *et al. PLoS ONE* 2010). Based on this assessment in consultation with the biotechnician a decision as to whether to sacrifice the animal will be made. Furthermore, we apply the general humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

The course of an infection with parasites can be readily predicted and typically mice will not experience adverse effects or display clinical symptoms before day 6 after inoculation or at parasitaemias below 1-2%. More typically though, clinical symptoms will only appear from day 7 onwards and at parasitaemias >10%. Variations between animal species and strains, parasite lines, and inoculation types and doses do exist. Therefore, we will monitor animal welfare and parasitaemia daily at the final stages of the infection, thus keeping the percentage of rare incidences where mice or rats unexpectedly display clinical symptoms and/or abnormal parasitaemia increases well below 1%.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

All animals will experience **moderate** levels of discomfort starting with injection of malaria parasites **and subsequent repeated drug administrations**. Parasitaemias will be monitored by collection of drops of blood for a limited period. Finally, the animals will be sacrificed by cervical dislocation or by terminal retro-orbital or intracardial bleeding. In rare cases, when the parasitaemia of an infected animal has unexpectedly developed faster infected animals may start displaying clinical symptoms of the infection, at which stage the level of discomfort may be moderate. When this is observed the experiment will be terminated and the animal will be sacrificed as indicated under the humane endpoints (section J).

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.

At the end of the experiment, the parasite-infected blood and/or specific organs need to be collected for further studies. Therefore, all animals will be sacrificed, either by terminal retro-orbital or intracardial bleeding under adequate general anaesthesia, or by cervical dislocation.

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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 3	Type of animal procedure Research tools

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.

These animal procedures are required to generate antisera to analyze and purify parasite proteins. These antisera are not commercially available. Rabbits and guinea pigs will be immunized with antigens, either recombinant or purified native proteins. In our experience, these are the most suitable animals for antibody production and may be conveniently used for ELISAs. In case that the antigens are sufficiently immunogenic, Freund's incomplete adjuvant will be used.

We will occasionally need rat liver cells e.g. to study biotransformation of drugs *in vitro*. For this reason we will sacrifice normal rats to dissect the livers. Cells will be cultured and drug metabolism *in vitro* will be studied by LC-MS.

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

As a general procedure the primary immunization will be by subcutaneous injection of 1-5 mg protein emulsified in Freund's incomplete adjuvant on the back of the animal, under general anesthesia. Booster injections using incomplete Freund's adjuvant, under general anesthesia, will be given up to 3 times, in general with 2-4 weeks intervals. Animals will be kept in experiments for a maximum of 6 months, until final bleeding for antiserum collection. Blood for determination of antibody titer will be drawn at the start of the experiment and at each booster injection. For collection of liver cells, animals will be sacrificed following standard protocols.

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

Not applicable

B. The animals

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

All animals will be obtained from registered EU breeders. We will use animals of either sex, from 8 to 30 weeks of age. In our experience, rabbits and guinea pigs are the most suitable animals to generate antisera against human skin proteins. In case an ELISA needs to be set up, the antisera of

these two species are combined very well. We expect that we will need to make antisera against 5 antigens in total in the entire project. We need 2 animals of each species per immunogen. In total 10 rabbits and 10 guinea pigs.

For collection of rat liver cells, which is the usual species for these experiments, we need 4 rats per year for 5 years. In total 20 rats.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
WNZ rabbits	Regular breeding	10	Young
Duncan Hartley guinea pigs	Regular breeding	10	Young
WT rats	Regular breeding	20	Young

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

Not applicable

Reduction

The number of animals (2 per immunogen) is the lower limit.

Refinement

We will use incomplete Freund's adjuvant (IFA) for the primary immunization rather than CFA, to minimize discomfort.

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

1) Animal welfare will be monitored daily. The experiments will be terminated and the animals sacrificed according to pre-specified conditions (see humane endpoints for more details).

2) There are no measurable adverse effects on the environment.

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.

Not applicable

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.

G. Location where the animals procedures are performed

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.

Injection of the adjuvant is painful. Pain relief by analgesics is likely to interfere with the immune response and is therefore not applied.

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 will experience stress due to the procedures.

Explain why these effects may emerge.

Stress is caused by the experimental procedures, such as injection of the immunogen and anesthesia before blood sampling.

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

Since the levels of discomfort result from the experimental procedures they cannot be prevented. The severity is minimized by closely monitoring the experiment.

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.

In the unlikely case that the animals experience ulceration of the injection site, rapid weight loss, severe distress/pain and abnormal behavior, these will serve as criteria for euthanasia.

Indicate the likely incidence.

Unlikely to be present as a result of the experiments.

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).

Injections with incomplete Freund's adjuvant cause moderate discomfort for the rabbits and guinea pigs. The animals will be sacrificed (terminal discomfort) for collection of serum. The rats used for liver cell collection will experience mild discomfort due to anesthesia before sacrificing them.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

L. Method of killing

No

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

Animals are killed to obtain blood for antiserum. Therefore, all animals will be sacrificed, either by terminal retro-orbital or intracardial bleeding under adequate general anaesthesia, or by cervical dislocation.

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

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0176
2. Titel van het project: Drug development for malaria
3. Titel van de NTS: Geneesmiddelenontwikkeling voor malaria
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 22-12-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 05-01-2016
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 12-01-2016 tot 15-01-2016
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 15-01-2016
 - advies aan CCD: 22-01-2016
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: 12-01-2016
 - Strekking van de vragen:

Project Proposal:

-3.2: De onderzoekers worden verzocht het woord 'primarily' te schrappen om verwarring over de aard van de te onderzoeken stoffen te vermijden.

-3.4: De onderzoekers willen de medicijnen testen in muizen en ratten. Waarom willen zij onderzoek in muizen doen, wanneer alleen de [REDACTED] in ratten overeenkomen met die in de mens? Waarom zullen zij niet het hele project in de rat uitvoeren? Een duidelijke rationale hiervoor ontbreekt in de projectbeschrijving.

Description of Animal Procedures:

DAP1.

-A (en K): Hoe lang blijven de dieren in metabole kooien? Een verblijf van meer dan 24 uur is ingeschaald als matig ongerief. De onderzoekers worden verzocht dit te specificeren en de inschatting van het ongerief bij onderdeel K eventueel aan te passen en aan te geven voor welk percentage van de dieren dit zal optreden.

-B: Uit de tekst blijkt dat er meer muizen dan ratten gebruikt zullen worden. Bedoelen de onderzoekers dat ze maximaal 300 dieren van beide soorten zullen gebruiken?

-I: Het gegeven antwoord op de eerste vraag is niet adequaat. Er wordt gevraagd welke andere vormen van ongerief, behalve pijn, kunnen optreden. De onderzoekers worden verzocht deze vraag opnieuw te beantwoorden in alle bijlagen met dierproeven.

DAP3,

-A, eerste vraag: De commissie neemt aan dat de antisera niet bedoeld zijn voor het onderzoek naar AD.

-K: Het ongerief voor de ratten is niet matig maar licht (doden zonder voorafgaande handeling). De onderzoekers worden verzocht het percentage dieren te vermelden waarvoor het ongerief licht zal zijn.

Niet-technische samenvatting:

- 3.5 De beschrijving van het ongerief komt niet overeen met de beschrijving daarvan in de dierproeven en de beschrijving onder 3.4. De onderzoekers worden verzocht deze beschrijvingen in overeenstemming te brengen.

- Datum antwoord: 15-01-2016
- Strekking van de antwoorden:

Project Proposal:

-3.2: geschrapt

-3.4: Dit was reeds beargumenteerd in de aanvraag maar dit is nu nog uitgebreider gedaan.

Description of Animal Procedures:

DAP1:

-A. het gebruik van metabole kooien is uit de aanvraag gehaald.

-B. Wij zullen maximaal 300 muizen en maximaal 300 ratten gebruiken voor PK, op basis van de bijgevoegde berekeningen.

- I: andere vormen van ongerief betreffen stress tgv bloedafname en anesthesie. Dit is aangepast in de DAPs.

DAP3:

-A: dit was een fout. Is aangepast in de nieuwe versie.

-K: De ratten worden gedood en daarna wordt de lever uitgenomen. Dit is licht ongerief.

Niet-technische samenvatting:

-3.5 Wij hebben dit aangepast.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to develop new, effective, safe, and cheap antimalaria drugs, with transmission blocking activity.' De onderzoekers focussen daarbij op [REDACTED] en varianten daarvan. Zij onderzoeken het werkingsmechanisme van deze stoffen op moleculair niveau, zodat zij met deze kennis een medicijn kunnen ontwikkelen dat zowel aangrijpt op asexuele stadia als op transmissie stadia van de parasiet. Malaria kent een hoge prevalentie in de bevolking van de tropen en de subtropen. Met name kinderen jonger dan vijf jaar kunnen overlijden aan de ziekte. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat deze ziekte een grote impact heeft op de maatschappij in de landen waar de parasiet voorkomt. Het malariaprobleem vormt met name in veel ontwikkelingslanden tevens een belemmering voor het verbeteren van de leefsituatie en de welvaart. Ook lopen reizigers naar deze landen het risico deze ziekte te krijgen. Er zijn anti-malaria middelen beschikbaar, maar in sommige delen van de wereld wordt de parasiet steeds resistenter hiertegen. De DEC acht meer inzicht in het werkingsmechanisme van anti-malaria middelen en de ontwikkeling van betere medicijnen van essentieel belang, aangezien de resultaten kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van betere therapieën voor malaria, hetgeen niet alleen zou resulteren in gezondheidswinst voor enorme aantallen mensen, maar ook een belangrijke bijdrage zou leveren aan het verbeteren van de leefsituatie in veel ontwikkelingslanden.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. Zij heeft belangrijke samenwerkingsverbanden met een internationale non-profit partner [REDACTED] en met lokale experts op het gebied van het aangrijpingspunt van [REDACTED]. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare inzichten in het werkingsmechanisme van [REDACTED] en varianten daarvan bij muizen of ratten, waardoor een effectief medicijn ontwikkeld kan worden dat aangrijpt op zowel de asexuele als op de transmissie stadia van de malariaparasiet.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief voor de muizen en ratten wordt hoofdzakelijk bepaald door de toediening van medicijnen en het effect daarvan op een infectie met al dan niet gemodificeerde parasieten. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde toediening van medicijnen p.o., i.v., s.c. of i.p., bloedafnames uit de staart of de wang, de infecties met parasieten door i.v., i.p. injecties of door geïnfecteerde muggen (dit laatste onder anesthesie), de immunisaties met of zonder

adjuvantia (incomplete Freund's adjuvant of milder), de toediening van medicijnen via het voedsel of i.v., i.p. of s.c. injecties, het doden door cervicale dislocatie, en in vivo imaging onder anesthesie (max. 2 maal in 48 uur) in als licht. Het ongerief als gevolg van het verbloeden of perfusie onder anesthesie is terminaal. De DEC is van mening dat de combinatie van deze factoren tot maximaal matig ongerief voor de dieren leidt. Het cumulatief ongerief voor de muizen en ratten in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als matig voor alle muizen en 98% van de ratten, en licht voor 2% van de ratten.

Het ongerief voor de konijnen en cavia's wordt bepaald door de immunisaties met een antigeen in combinatie met incomplete Freund's adjuvant of complete Freund's adjuvant indien het eerstgenoemde adjuvant niet voldoende werkt. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde injecties onder anesthesie (maximaal 4 maal) en de gevolgen daarvan in als matig. Het ongerief veroorzaakt door de bloedafnames schat de DEC in als licht. Het ongerief als gevolg van het verbloeden is terminaal. Het cumulatief ongerief voor de konijnen en cavia's in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als matig voor alle dieren.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. Farmacokinetiek kan alleen bestudeerd worden bij proefdieren, omdat er nog geen in vitro alternatief voor is ontwikkeld. Malariaparasieten hebben een complexe interactie met hun gastheer, waardoor het effect van anti-malaria middelen alleen goed in vivo bestudeerd kan worden. Antistoffen tegen bepaalde eiwitten kunnen alleen efficiënt in proefdieren gemaakt worden. De onderzoekers gebruiken hiervoor konijnen en cavia's, omdat lagere diersoorten hier niet geschikt voor zijn. De toxiciteit van de medicijnen wordt in *in vitro* modellen bepaald.
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 en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door het inbouwen van relevante go/no go momenten, door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervolggelaxperimenten en door het combineren van experimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 1200 muizen, 1220 ratten, 10 konijnen en 10 cavia's.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. Het gekozen model veroorzaakt het minste ongerief voor de dieren, omdat zij voordat ze ziek worden al worden gedood en de vermeerdering van de malariaparasieten zo mogelijk door imaging wordt gevolgd. Door de toxiciteit van nieuwe medicijnen eerst *in vitro* uit te testen, wordt het risico op onverwachte bijwerkingen verkleind. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

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

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in het werkingsmechanisme van ██████████ en varianten daarvan bij muizen of ratten, waardoor een effectief medicijn ontwikkeld kan worden dat aangrijpt op zowel de asexuele als op de transmissie stadia van de malariaparasiet. De resultaten zullen bijdragen aan de ontwikkeling van betere anti-malaria middelen. Het belang van meer inzicht in de werkingsmechanismen van ██████████ en het beschikbaar komen van nieuwe medicijnen voor malaria acht de DEC essentieel, gezien de omvang van dit wereldwijde gezondheidsprobleem en de negatieve gevolgen die dit gezondheidsprobleem heeft voor de leefsituatie en welvaart van een groot deel van de wereldbevolking.

Tegenover dit essentiële belang staat het gegeven dat vrijwel alle dieren matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van de infectie met parasieten en de daarop volgende behandeling met medicijnen, in combinatie met de benodigde handelingen. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

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

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**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
AVD103002016403

Bijlagen

2

Datum 26 januari 2016

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 26 januari 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002016403. 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: 10300
Naam instelling of organisatie: Radboud Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10
Postbus: 9101, [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB [REDACTED] NIJMEGEN

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

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 april 2016
Geplande einddatum: 1 april 2021
Titel project: Drug development for malaria
Titel niet-technische samenvatting: Geneesmiddelenonderzoek voor malaria
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1441,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen: Melding Machtiging
 DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Nijmegen
Datum: 22 januari 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**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
AVD103002016403

Bijlagen

2

Datum 26 januari 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 26 januari 2016

Vervaldatum: 25 februari 2016

Factuurnummer: 16700403

Ordernummer: 040823-461220 /2015-0176/

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002016403	€

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.

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 8 februari 2016 16:50
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: aanvullende informatie aanvraag AVD103002015403
Categorieën: [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

De commissie heeft bij de onderzoekers nagevraagd welke methode voor het herhaaldelijk verzamelen van bloed zij zullen gebruiken, omdat wij vermoedden dat de onderzoekers zich hebben vergist bij hun omschrijving daarvan. De onderzoekers hebben bevestigd dat zij zich hebben vergist in de gebruikte terminologie: zij hebben vermeld een 'tailsnip' te zullen gebruiken, terwijl zij een 'tailcut' bedoelden. De eerste keer wordt een sneetje in de staart gemaakt waaruit een druppel bloed wordt opgevangen, waarna de wond zich sluit. Voor de herhaalde afname van een druppeltje bloed wordt het ontstane korstje telkens opengemaakt. De commissie is van mening dat dit een goede methode is voor herhaalde kleinere bloedafnames binnen 24 uur. Indien de onderzoekers dit inderdaad met een herhaalde tailsnip hadden willen doen, dan had de commissie hiermee niet ingestemd omdat dit niet de meest verfijnde methode is. De commissie schat het ongerief van de bedoelde herhaalde bloedafnames in als licht. Het totale volume aan bloed dat wordt afgenomen blijft ruim onder de 10% van het circulerend bloedvolume. Na 24 uur wordt het dier gedood. Wanneer het dier langer in de proef zou blijven, zou het mogelijk bloedarmoede kunnen ontwikkelen door deze herhaalde afname van kleine bloedvolumina, maar dat is in dit geval niet aan de orde. Op grond van deze overwegingen heeft de commissie het ongerief voor de dieren door de herhaalde bloedafname van maximaal 5 maal 20 microliter (totaal afgenomen volume maximaal 100 microliter) in 24 uur ingeschat als licht.

Met vriendelijke groet,

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: woensdag 3 februari 2016 15:02
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende informatie aanvraag AVD103002015403

Geachte leden van RUDEC,

Bij de CCD is een aanvraag tot projectvergunning ingediend waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het betreft het project "Drug development for malaria" met aanvraag nummer AVD103002015403. Uw advies dateert van 22 januari 2016.

In deze aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden m.b.t. de herhaalde bloedafname in dierproef 3.4.4.1. (DAP1).

In de aanvraag wordt beschreven dat vóór de toediening van een stof en binnen 24uur daarna maximaal 5 keer bloed wordt afgenomen door 'tail snip' tot een maximaal volume van 100ul. Wij willen u vragen om aanvullend advies betreffende de voorgestelde methode en het bloedvolume, en hoe u dit heeft meegewogen in uw ethische afweging.

In literatuur staat dat deze methode niet het meest aanbevolen is, en indien nodig om toch via staart snip bloed af te nemen, dan alleen onder algehele anesthesie bij voorkeur in een terminaal experiment. Daarnaast staat er dat wanneer herhaaldelijke bloedafname bij dezelfde muis wenselijk is, dan niet meer dan 4 keer binnen 24uur en 10ul/keer, en liever met een canule. Het totale volume van 100ul zoals in de voorliggende aanvraag is beschreven ligt boven deze aanbevolen hoeveelheid.

Literatuur bron:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3043327/>
<https://www.nc3rs.org.uk/mouse-tail-snip-surgical>

<https://www.nc3rs.org.uk/mouse-decision-tree-blood-sampling>

Omdat de behandeltermijn niet opgeschort kan worden wanneer de CCD om aanvullend advies wordt gevraagd en wij deze vraag eventueel ook aan de onderzoeker willen voorleggen verzoeken we u om uiterlijk maandag, 8 februari 2016, u reactie hierop naar ons toe te sturen.

Met vriendelijke groet,

██████████
██████████

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629. The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101,
6500 HB NIJMEGEN



**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
AVD103002016403
Bijlagen
1

29 FEB 2016

Datum

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 26 januari 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Drug development for malaria" met aanvraagnummer AVD103002016403. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de algemene voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

U kunt met uw project "Drug development for malaria" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 april 2016 tot en met 31 maart 2021. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de looptijd van de vergunning maximaal 5 jaar is. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 22 januari 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 8 februari 2016 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. De DEC heeft gereageerd op de vraag van de CCD over het gebruik van de 'tail snip' methode en het ongerief dat ermee gepaard gaat. Zij heeft, in overeenstemming met de aanvrager, aangegeven dat er een vergissing aan de kant van de aanvrager was en dat eigenlijk 'tail cut' bedoeld wordt.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de

Dierexperimentencommissie. Wij nemen het advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Met het oog op art. 10a, lid 1, worden twee algemene voorwaarden toegevoegd. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

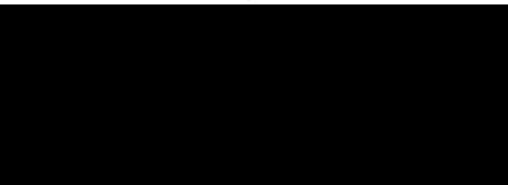
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



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 Katholieke Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 9101, [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 april 2016 tot en met 31 maart 2021, voor het project "Drug development for malaria" met aanvraagnummer AVD103002016403, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 26 januari 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 januari 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 januari 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 22 januari 2016, ontvangen op 26 januari 2016, en aangevuld op 8 februari 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Pharmacokinetics of antimalarial drugs	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / C57BL/6; beide geslachten; jonge dieren	300	Matig / moderate	
Pharmacokinetics of antimalarial drugs	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wistar of Brown Norway; beide geslachten; jonge dieren	300	Matig / moderate	
Efficacy studies of antimalarial drugs	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / beide geslachten; jonge dieren	900	Matig / moderate	
Efficacy studies of antimalarial drugs	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / beide geslachten; jonge dieren	900	Matig / moderate	
Research tools	Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) / jonge dieren; beide geslachten	10	Matig / moderate	
Research tools	Cavia's (<i>Cavia porcellus</i>) / Duncan Hartle; jonge dieren; beide geslachten	10	Matig / moderate	
Research tools	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / beide geslachten; jonge dieren	20	Licht / mild	

Voorwaarden

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

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat 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.

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 29 februari 2016 10:27
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Beslissing aanvraag projectvergunning dierproeven
Bijlagen: Beslissing aanvraag projectvergunning dierproeven AVD103002016403.pdf

Geachte heer/mevrouw,

Deze brief 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: maandag 29 februari 2016 10:53
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: terugkoppeling besluit op aanvraag AVD103002016403

Geachte leden van RUDEC,

Op 22 januari 2016 heeft u advies uitgebracht op de projectaanvraag met titel 'Drug development for malaria', en aanvraagnummer AVD103002016403. Wij danken u voor uw advies en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug. De CCD heeft besloten de vergunning te verlenen, onder de volgende algemene voorwaarden:

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat de go/no go momenten worden afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

De aanvrager en de verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

We hopen u op deze wijze voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl