

Inventaris Wob-verzoek W16-22S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2016411</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel oud				x	x		x	
3	Niet-technische samenvatting oud			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	DEC-advies				x	x	x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Projectvoorstel herzien				x	x		x	
10	Niet-technische samenvatting herzien	x							
11	Advies CCD		x						x
12	Beschikking en vergunning				x		x	x	



# Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

## 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	21000
		<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	Farma Research Animal Health B.V.
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
		KvK-nummer	09153845
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	Toernooiveld 300H
		Postbus	
		Postcode en plaats	6525 EC Nijmegen
		IBAN	NL08RABO0113698461
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Farma Research Animal Health B.V.
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 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 01 - 03 - 2016
- Einddatum 01 - 03 - 2018
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Dierstudies ten behoeve van de markttoelating van een [redacted] bevattend diergeneesmiddel bestemd voor siervogels
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Dierstudies ten behoeve van de markttoelating van een diergeneesmiddel voor siervogels
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RUDEC (Radboud)
- Postadres Postbus 9101 (628)  
6500 HB Nijmegen
- E-mailadres [redacted]

## 4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1441 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

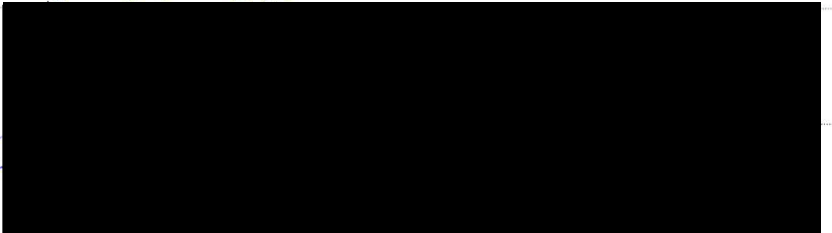
Plaats

Nijmegen

Datum

01-02-2016

Handtekening





## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

De aanvrager van dit project is een Contract Research Bedrijf, dat projecten uitvoert in opdracht van veterinaire farmaceutische bedrijven. Een bedrijf dat een markttoelating voor een diergeneesmiddel wil verkrijgen, dient hiertoe een registratiedossier van het middel samen te stellen, waarin productsamenstelling, veiligheid voor het dier, veiligheid voor de mens en werkzaamheid beschreven zijn. Ten behoeve van dit dossier dienen zowel in-vitro als in-vivo studies te worden uitgevoerd. De in-vivo studies betreffen oa studies met het doeldier. Dit is de diersoort waarvoor men markttoelating wil verkrijgen.

De studies dienen volgens de wettelijke richtlijnen (zie hieronder) te worden uitgevoerd met het middel zoals men het op de markt wil brengen en toegediend zoals dat later in de praktijk zal gebeuren. Het dossier wordt beoordeeld door nationale Registratieautoriteiten (bv in Nederland: College ter beoordeling Geneesmiddelen: CBG; in Engeland: Veterinary Medicines Directorate: VMD) of Europese autoriteit (European Medicines Agency: EMA) in Londen.

Dit projectvoorstel betreft studies ten behoeve van de registratie in Europa van een [REDACTED] bevattend diergeneesmiddel, bestemd voor de behandeling van [REDACTED] bij siervogels, veroorzaakt door [REDACTED] wordt in de praktijk al gebruikt bij vogels. Er is dus wel ervaring met de stof, maar er is geen product geregistreerd, zodat werkzaamheid en veiligheid niet onderbouwd worden door goed uitgevoerde registratiestudies.

Op het dossier is de "minor uses/minor species" (MUMS) regeling van toepassing. Deze regeling is ingesteld om het mogelijk te maken dat voor weinig vóórkomende indicaties of weinig vóórkomende doeldieren, toch geregistreerde diergeneesmiddelen beschikbaar komen.

Men stelt in die gevallen minder stringente eisen.

Voor het verkrijgen van de markttoelating van het vogelproduct wordt de Decentrale Procedure (DCP) gevolgd, waarbij Engeland optreedt als Reference Member State (RMS). Bij deze procedure wordt het dossier ingediend bij de EU landen waar men toelating wil verkrijgen. Eén land (RMS) beoordeelt het dossier. De andere nemen deze beoordeling over.

Ten behoeve van het dossier [REDACTED] is uitgebreid overleg geweest met VMD (Veterinary Medicines Directorate) in Engeland. Het dossier zoals het al was ingediend, was gebaseerd op literatuur zonder in-vivo studies. De VMD eist echter toch een aantal studies met het doeldier. Met name zijn dit [REDACTED]

De studies zullen worden uitgevoerd conform de volgende Europese richtlijnen:

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]

De studies worden uitgevoerd conform de kwaliteitsrichtlijnen GLP of VICH-GCP:

- OECD Principles of Good Laboratory Practice (ENV/MC/CHEM(98)17)
- VICH Topic GL9. Guideline on good clinical practices (CVMP/VICH/595/98-FINAL)

Door de studies onder GLP of VICH-GCP uit te voeren, kunnen ze in de gehele wereld gebruikt worden ten behoeve van registratiedossiers. Het voorkomt dat studies elders herhaald moeten worden.

### 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?

Vraagstellingen:

- Wat is de juiste dosering van het diergeneesmiddel [REDACTED]
- Wat is [REDACTED] de veiligheid van het diergeneesmiddel en de veiligheidsmarge in het geval van overdosering?
- Wat is [REDACTED] de veiligheid van het diergeneesmiddel? [REDACTED]

Doel is het verkrijgen van een EU markttoelating voor het te testen product, als diergeneesmiddel voor siervogels, in het bijzonder:

- Psittaciformes (papegaaiaachtigen)
- Falconiformes (valkachtigen)
- Accipitriformes (met name havikachtigen)
- Strigiformes (uilen)
- Galliformes (hoenderachtigen)
- Columbiformes (duifachtigen)

Farma Research Animal Health heeft veel ervaring met het bepalen van de registratiestrategie en heeft daartoe regelmatig contact met registratieautoriteiten in diverse landen. De studies worden uitgevoerd op verzoek van dezelfde autoriteiten. Door dit overleg wordt voorkomen dat is er later toch discussie ontstaat over de uitgevoerde studies.

Farma Research Animal Health voert zelfstandig al meer dan 10 jaar dierstudies uit tbv registraties. De dierstudies worden uitgevoerd in samenwerking met een dierenarts die zich bijna geheel gericht heeft op de vogeldiergeneeskunde. Hij behandelt al jaren vele soorten. De handelingen worden verricht door hem en door een werknemer van zijn praktijk. Ook deze werknemer is zeer ervaren wat betreft het hanteren van vogels.

Gezien de ervaring van Farma Research Animal Health en de betrokken personen zal de haalbaarheid van het project geen probleem zijn.

### 3.3 Belang

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

Het project wordt uitgevoerd in het kader van het samenstellen van een dossier ten behoeve van de EU markttoelating van het product als diergeneesmiddel voor siervogels.

Deze markttoelatingsprocedure vormt een waarborging voor de werkzaamheid van het middel en voor de veiligheid voor het doeldier.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

De markttoelating wordt aangevraagd voor veel vogelsoorten. Er zullen echter bij slechts 2 soorten dierproeven worden uitgevoerd: postduif en parkiet ([REDACTED])

Daarnaast zal een veldstudie uitgevoerd worden met geïnfecteerde dieren die op de dierenartsenpraktijk worden aangeboden. Deze veldproef valt buiten de projectaanvraag.

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

[redacted]), dient de veiligheid ook dmv dierproeven te worden onderzocht. Dit gebeurt op 2 manieren:

- Onderzoek naar veiligheid bij lage doseringen [redacted]
- Onderzoek naar veiligheid bij hoge doseringen [redacted]

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.

Zie antwoord bij vraag 3.4.2.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	[redacted] studie Duif
2	[redacted] studie Parkiet
3	[redacted] studie Duif
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	





## Format

### Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

## 1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Dierstudies ten behoeve van de markttoelating van een diergeneesmiddel voor siervogels
1.2 Looptijd van het project	2 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Vogel, diergeneesmiddel, veiligheid, werkzaamheid, dosering

## 2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.  <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input checked="" type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

## 3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Om een diergeneesmiddel op de markt te mogen brengen, is de fabrikant wettelijk verplicht een registratiedossier samen te stellen. In dit dossier worden de samenstelling, de productie, de indicatie (voor welke ziekte zal het middel worden toegepast), de werkzaamheid en de dosering beschreven. Daarnaast ook de veiligheid voor het dier, voor de mens en voor het milieu. Dit dossier wordt door de overheden beoordeeld. Pas na goedkeuring mag het middel verkocht en gebruikt worden. Ten behoeve van het dossier moeten allerlei proeven worden uitgevoerd. Deels in het laboratorium en deels bij dieren. Proeven worden ook uitgevoerd met het zogenaamde doeldier. Dit is de diersoort waarvoor men het diergeneesmiddel op de markt wil brengen.</p> <p>Dit project betreft de ontwikkeling van een product voor siervogels. Dit zijn vogels die als hobby gehouden. Bv duiven, sierkippen, papegaaien en roofvogels. Voor deze diersoorten zijn weinig tot geen diergeneesmiddelen op</p>
---	---

	de markt. Dit project betreft een diergeneesmiddel voor verschillende vogelsoorten. Voor het middel moeten ten behoeve van de registratie, proeven gedaan worden om de juiste dosering en de veiligheid te bepalen. De juiste dosering is belangrijk voor de werkzaamheid. Bij de veiligheid wordt oa gekeken naar wat er gebeurt bij overdosering. Een middel is veilig als een overdosering niet direct leidt tot ernstige afwijkingen.
3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Dit project moet leiden tot een geregistreerd product voor siervogels. Registratie van diergeneesmiddelen waarborgt de kwaliteit en werkzaamheid.
3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Vogels: 48
3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	Minder eetlust, sloomheid, bloedafwijkingen
3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	20 dieren (42%) licht 28 dieren (58%) matig
3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Euthanasie ten behoeve van sectie

## 4 Drie V's

4.1 <b>Vervanging</b> Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	Het is wettelijk verplicht deze studies uit te voeren bij het doeldier.
4.2 <b>Vermindering</b> Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Uitgangspunt voor het aantal dieren zijn de EU Richtlijnen voor deze studies. Daarin wordt het aantal dieren vermeld dat minimaal gebruikt moet worden. In vergelijking met de aantallen in deze richtlijnen zijn toch verschillende manieren toegepast om tot vermindering te komen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Op het dossier is de "minor uses/minor species" (MUMS) regeling van toepassing. Deze regeling is ingesteld om het mogelijk te maken dat voor weinig vóórkomende indicaties of weinig vóórkomende doeldieren, toch geregistreerde diergeneesmiddelen beschikbaar komen. Men stelt in die gevallen minder stringente eisen.</li> <li>• Het product is bestemd voor veel vogelsoorten. Er worden echter slechts proeven gedaan met 2 soorten. Dit in afwijking van de eis</li> </ul>

- dat met alle doeldiersoorten proeven moeten worden gedaan.  
• Door in een proef waarmee de dosering wordt getest ook de veiligheid te testen, kan in de veiligheidsstudie het aantal dieren meer dan gehalveerd worden.

#### 4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Het is wettelijk verplicht deze studies uit te voeren bij het doeldier. De proeven om de doseringen en de veiligheid vast te stellen, worden voorgeschreven in de wettelijke EU Richtlijnen.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

De dieren worden gehanteerd en verzorgd door zeer ervaren mensen op het gebied van vogels.  
De dieren worden zoveel mogelijk in groepen of met 2 gehuisvest. Alleen gedurende een aantal (deels heel korte) periodes zitten de dieren alleen om mest te kunnen verzamelen.  
De gezondheidstoestand van de dieren wordt intensief geobserveerd en gedocumenteerd. Indien een dier veel lijdt, dan wordt het uit de proef genomen.

## **5** In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



# Bijlage

## Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	21000				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Farma Research Animal Health B.V.				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 30%;">Volgnummer</th> <th style="width: 70%;">Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="background-color: black; color: white;">[Redacted]</td> </tr> </tbody> </table>	Volgnummer	Type dierproef	1	[Redacted]
Volgnummer	Type dierproef					
1	[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.

In het kader van de opbouw van het dossier tbv de markttoelating van diergeneesmiddelen moet de juiste dosering bepaald worden. Dit wordt gedaan door middel van de volgende type studies:

- Dose determination  
Groepen dieren worden behandeld met verschillende doseringen. Op basis van de effectiviteit wordt de beste dosering geselecteerd. Deze proef wordt doorgaans uitgevoerd in een vroeg stadium van de productontwikkeling met de actieve component.
- Dose confirmation  
In deze studie wordt de effectiviteit van de geselecteerde dosering bevestigd. Deze proef wordt uitgevoerd met de volledige, uiteindelijke formulering. Dus met het product zoals dat uiteindelijk op de markt komt.

[Redacted text block containing multiple lines of blacked-out content]

Omdat er zorg is met betrekking tot de veiligheid van [REDACTED] wordt een veiligheidsgedeelte ingevoegd in de studie. Dit bestaat uit bloedonderzoek en uitgebreide sectie. Dit geeft informatie over de veiligheid bij de 2 lage doseringen ([REDACTED]). Samen met de [REDACTED] [REDACTED], wordt dan een volledig beeld van de veiligheid verkregen.

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.

**Opzet dierstudie**

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

Onderbouwing doseringsgroepen

Op basis van ervaring, literatuur en het overleg met VMD gaat men uit van een dosering van [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]. Men wil nu ook een hogere dosering testen, namelijk [REDACTED]

Nadeel van het [REDACTED] Dit in tegenstelling tot het [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]

Conform de richtlijn, dient de studie een negatieve controlegroep te bevatten. De studie wordt blind uitgevoerd, om elke mogelijke vorm van bias te voorkomen. Daarom krijgen de controle dieren een placebo. Het placebo wordt toegediend in hetzelfde volume als de doseringsgroepen. Er zijn dus 2 placebogroepen nodig.

Onderbouwing bloedafname

Omdat er op basis van literatuur, zorg is bij de VMD met [REDACTED] moet de veiligheid bij deze soort onderzocht worden. Door bloedonderzoek voor de [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]. Dit ter ondersteuning van de hoofdparameter voor effectiviteit [REDACTED]

Sectie

Algemeen macroscopisch + histologie: ivm beoordelen veiligheid [REDACTED]

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

Het aantal dieren is niet op basis van statistiek bepaald.

Besloten is om 7 dieren per testgroep te gebruiken:

- Om uitval van dieren te kunnen opvangen

In principe tellen de placebogroepen hetzelfde aantal dieren als de doseringsgroepen.

Gezien de MUMS-status van het dossier is dit acceptabel.

## B. De dieren

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

Postduif, volwassen.

Herkomst: op de dierenartsenpraktijk aangeboden dieren. Daarna aangekocht. Het geslacht speelt geen rol bij het includeren van 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.

### Vervanging

Niet van toepassing. Volgens de wet dienen deze registratiestudies uitgevoerd te worden bij het doeldier (= diersoort waarvoor markttoelating wordt gevraagd)

### Vermindering

Er is op verschillende manieren tot vermindering gekomen.

- Op het dossier is de "minor uses/minor species" (MUMS) regeling van toepassing. Daardoor worden minder stringente eisen gesteld en kan men ook volstaan met minder en/of beperkter dierproeven.
- Er worden proeven gedaan met slechts 2 diersoorten en niet bij alle diersoorten waarvoor markttoelating wordt gevraagd.

- [Redacted]
- [Redacted]
- [Redacted]
- [Redacted]

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

De dieren worden gehanteerd en verzorgd door zeer ervaren personen op dit gebied. De veterinaire handelingen worden verricht door een dierenarts, die in de dagelijkse praktijk zeer veel vogels behandelt.

## 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.

De proeven zijn verplicht ten behoeve van de markttoelating van dit product.  
Met dit product zijn deze proeven nooit uitgevoerd.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

De dieren worden gehuisvest conform bijlage III. [REDACTED]

### 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.

[REDACTED]

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

De dieren moeten verzorgd en hanteerd worden door mensen met veel ervaring met deze soorten. Dat is niet het geval in reguliere proefdierinstellingen.

De proef wordt uitgevoerd onder verantwoordelijkheid van Farma Research Animal Health als vergunninghouder. Bij alle handelingen zijn mensen van de vergunninghouder aanwezig.

De locatie is al geïnspecteerd door de proefdierdeskundige van vergunninghouder. Dit zal nogmaals gebeuren voor aanvang van de proef.

De locatie wordt aangemeld bij NVWA en voor personeel van de dierenarts, betrokken bij de proef, wordt ontheffing aangevraagd op grond van artikel 6 lid 2 van de Dierproevenregeling 2014, wat betreft wettelijke eisen ten aanzien van opleiding.

## 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.

Pijn zal optreden tgv bloedafname. Pijnstilling dmv injectie geeft hetzelfde ongerief.

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

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Deze afwijkingen werden gezien bij een dosering van [redacted]. Omdat in de studie [redacted], wordt de kans klein geacht dat deze afwijkingen zullen optreden. Deze literatuurgegevens vormen wel de basis voor het safety deel van deze studie.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

Geen. De studie wordt deels uitgevoerd om te zien of deze verschijnselen optreden. De dieren worden dagelijks geobserveerd.

### 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.

Eerstig verlies aan eetlust, ernstige sloomheid, algemeen ziek zijn.

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

Omdat het product [redacted] wordt de kans klein geacht, dat de criteria gehaald worden. Uit te sluiten is het niet voor 100%. Het onderzoek naar het optreden van bijverschijnselen vormt juist één van de doelen van de studie. Indien een dier voortijdig uit de proef gehaald moet worden, dan zal sectie gedaan worden.

### K. Classificatie van ongerief

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

Licht



## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Sectie vormt onderdeel van de studie

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer                     | Type dierproef                              |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="2"/> | <input type="text" value="studie Parkiet"/> |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In het kader van de opbouw van het dossier tbv de markttoelating van diergeneesmiddelen moet de dosering,

Het te testen product is een  bevattend diergeneesmiddel, bestemd voor de behandeling van  bij siervogels,

Conform de geldende richtlijn voor

de belangrijkste parameter. Als ondersteuning wordt ook  uitgevoerd,

De studie wordt uitgevoerd met  dieren. De dieren worden geselecteerd op basis van

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.

### Opzet dierstudie

[Redacted text describing the experimental design]

### Onderbouwing doseringsgroepen

[Redacted text]

- [Redacted text]
- [Redacted text]

[Redacted text]

Op basis van literatuur en ervaring en in overleg met VMD is gekozen voor de hierboven beschreven doseringen.

Conform de richtlijn, dient de studie een negatieve controlegroep te bevatten. De studie wordt blind uitgevoerd, om elke mogelijke vorm van bias te voorkomen. Daarom krijgen de controle dieren een placebo. Het placebo wordt toegediend op dezelfde manier als de doseringsgroepen. Er zijn dus 2 placebogroepen nodig.

[Redacted text]

[Redacted text]. Dit ter ondersteuning van de hoofdparameter voor effectiviteit ([Redacted text])

### Sectie

[Redacted text]

Secundair: Algemeen macroscopisch + histologie: ivm beoordelen veiligheid

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

Het aantal dieren is niet op basis van statistiek bepaald.

[Redacted text]

[Redacted text] Besloten is om 7 dieren per groep te gebruiken:

- Om uitval van dieren te kunnen opvangen.
- [Redacted text]

In principe tellen de placebogroepen hetzelfde aantal dieren als de doseringsgroepen. [Redacted text]

[Redacted text]

Gezien de MUMS-status van het dossier is dit acceptabel.

## B. De dieren

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

Parkiet, volwassen.

Herkomst: op de dierenartspraktijk aangeboden dieren. Daarna samen met dieren uit dezelfde volière aangekocht. Het geslacht speelt geen rol bij het includeren van 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.

### Vervanging

Niet van toepassing. Volgens de wet dienen deze registratiestudies uitgevoerd te worden bij het doeldier (= diersoort waarvoor markttoelating wordt gevraagd)

### Vermindering

Er is op verschillende manieren tot vermindering gekomen.

- Op het dossier is de "minor uses/minor species" (MUMS) regeling van toepassing. Daardoor worden minder stringente eisen gesteld en kan men ook volstaan met minder en/of beperkter dierproeven.
- [Redacted]
- [Redacted]
- [Redacted]

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

De dieren worden gehanteerd en verzorgd door zeer ervaren personen op dit gebied. De veterinaire handelingen worden verricht door een dierenarts, die in de dagelijkse praktijk zeer veel vogels behandelt.

## 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.

De proeven zijn verplicht ten behoeve van de markttoelating van dit product.  
Met dit product zijn deze proeven nooit 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.

In de Richtlijn worden parkieten niet genoemd. Uitgegaan zou kunnen worden van zebra vinken, die wel genoemd worden. Zebra vinken wegen 12 – 15 gram, parkieten 30 – 40 gram. Zebra vinken moeten, bij een aantal van 20, gehuisvest worden in ruimtes van minimaal 2 m<sup>2</sup> met een hoogte van minimaal 2 meter.

Als gekozen zou worden voor de gezamenlijke huisvesting in een grote ruimte, dan zouden de dieren diverse malen gevangen moeten worden. Dit geeft zeer veel stress en zal zelfs leiden tot dode dieren, omdat ze zich doodvliegen. Daarom is besloten de dieren te huisvesten in kleine tentoonstellingskooitjes; afmetingen 50 x 20 x 30 cm. Dit zijn de kooien waarin de vogels gedurende 1 – 2 weken gehuisvest zijn bij tentoonstellingen. Vangen vanuit deze kleine kooien levert weinig stress op. Omdat papegaaiachtigen sociale dieren zijn, worden ze per 2 gehuisvest.

- 
- 

### 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?

De dieren moeten verzorgd en hanteerd worden door mensen met veel ervaring met deze soorten. Dat is niet het geval in reguliere proefdierinstellingen.

De proef wordt uitgevoerd onder verantwoordelijkheid van Farma Research Animal Health als vergunninghouder. Bij alle handelingen zijn mensen van de vergunninghouder aanwezig.

De locatie is al geïnspecteerd door de proefdierdeskundige van vergunninghouder. Dit zal nogmaals gebeuren voor aanvang van de proef.

De locatie wordt aangemeld bij NVWA en voor personeel van de dierenarts, betrokken bij de proef, wordt ontheffing aangevraagd op grond van artikel 6 lid 2 van de Dierproevenregeling 2014, wat betreft wettelijke eisen ten aanzien van opleiding.

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Onrust, lichte stress

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Ivm ██████████, vangen

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

In de periodes dat het mogelijk is, worden de dieren per 2 gehuisvest. Huisvesting in de kleinere kooien voorkómt juist schadelijke effecten.

### 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.

Matig

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Sectie vormt onderdeel van de studie.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	21000				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Farma Research Animal Health B.V.				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table border="1" style="border-collapse: collapse; width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Volgnummer</th> <th style="text-align: left;">Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">3</td> <td style="padding: 2px;">[redacted] studie Duif</td> </tr> </tbody> </table>	Volgnummer	Type dierproef	3	[redacted] studie Duif
Volgnummer	Type dierproef					
3	[redacted] studie Duif					

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In het kader van de opbouw van het dossier tbv de markttoelating van diergeneesmiddelen moet de veiligheid voor het doeldier aangetoond worden. [redacted]  
Dit soort proeven worden uitgevoerd met gezonde dieren, met het product, zoals het later op de markt zal komen. Voor farmaceutische producten is het basisprincipe van de opzet als volgt:

- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]

Afhankelijk van het soort product en diersoort kan hiervan afgeweken worden.

Zoals beschreven in het projectvoorstel is er in dit project gekozen voor vereenvoudigde proeven. [redacted]  
[redacted] worden alleen 2 overdoseringen getest. Samen met de negatieve controle (placebo) en 2 lage doseringen ([redacted]) uit de tevens uit te voeren [redacted] wordt toch een volledig beeld van de veiligheid verkregen. Het aantal toedieningen [redacted] is gelijk aan het aantal, zoals zal worden voorgeschreven na markttoelating.

Het te testen product is een [redacted] bevattend diergeneesmiddel, bestemd voor de behandeling van [redacted] siervogels, veroorzaakt door [redacted]  
De veiligheid wordt beoordeeld op basis van algemene gezondheidstoestand, lichaamsgewicht, bloedonderzoek en sectiebeeld.

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.

### Opzet dierstudie

[Redacted text describing the experimental design]

### Onderbouwing doseringsgroepen

Zoals hierboven beschreven, dienen in een [redacted] In de literatuur worden doseringen beschreven tot meer dan [redacted] werden bijverschijnselen gezien. Uitgaande van maximaal [redacted] als aan te bevelen dosering, is een [redacted] gekozen als maximaal te testen. Dit wordt voldoende geacht voor de beoordeling van de veiligheid. Na markttoelating zal het product in dezelfde frequentie gegeven worden: [redacted]

### Onderbouwing bloedafname

In de literatuur worden afwijkingen gemeld in het bloed bij overdosering, oa [redacted]

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

Het aantal dieren is niet op basis van statistiek bepaald. De desbetreffende richtlijn ([redacted]). Echter vanwege de MUMS status van het dossier kan hiervan afgeweken worden. De VMD wil de veiligheid bij [redacted] onderzocht hebben met dierproeven, omdat [redacted]. Vanwege de MUMS status is besloten de groepen te verkleinen. Daarnaast worden alleen de [redacted]

### B. De dieren

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

Postduif, volwassen.

Gezond

Aangekocht van duivenhouders. Het geslacht speelt geen rol bij het includeren van dieren. [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.

#### Vervanging

Niet van toepassing. Volgens de wet dienen deze registratiestudies uitgevoerd te worden bij het doeldier (= diersoort waarvoor markttoelating wordt gevraagd)

#### Vermindering

Er is op verschillende manieren tot vermindering gekomen.

- Op het dossier is de "minor uses/minor species" (MUMS) regeling van toepassing. Daardoor worden minder stringente eisen gesteld en kan men ook volstaan met minder en/of beperkter dierproeven.
- Er worden proeven gedaan met slechts 2 diersoorten en niet bij alle diersoorten waarvoor markttoelating wordt gevraagd.
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- Het aantal dieren in de groepen is verkleind ten opzichte van het minimaal aantal zoals vermeld in de desbetreffende richtlijn.

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

De dieren worden gehanteerd en verzorgd door zeer ervaren personen op dit gebied. De veterinaire handelingen worden verricht door een dierenarts, die in de dagelijkse praktijk zeer veel vogels behandelt.

## 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.

De proeven zijn verplicht ten behoeve van de markttoelating van dit product.  
Met dit product zijn deze proeven nooit 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?

De dieren moeten verzorgd en hanteerd worden door mensen met veel ervaring met deze soorten. Dat is niet het geval in reguliere proefdierinstellingen.

De proef wordt uitgevoerd onder verantwoordelijkheid van Farma Research Animal Health als vergunninghouder. Bij alle handelingen zijn mensen van de vergunninghouder aanwezig.

De locatie is al geïnspecteerd door de proefdierdeskundige van vergunninghouder. Dit zal nogmaals gebeuren voor aanvang van de proef.

De locatie wordt aangemeld bij NVWA en voor personeel van de dierenarts, betrokken bij de proef, wordt ontheffing aangevraagd op grond van artikel 6 lid 2 van de Dierproevenregeling 2014, wat betreft wettelijke eisen ten aanzien van opleiding.

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

In de literatuur worden genoemd: sloomheid, verminderde eetlust, ataxie, leucopenie. [REDACTED]

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

Geen. De studie wordt uitgevoerd om te zien of deze verschijnselen optreden. De dieren worden dagelijks geobserveerd.

### 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.

Ernstig verlies aan eetlust, ernstige sloomheid, algemeen ziek zijn.

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

In theorie loopt 100% van de dieren de kans dat de criteria gehaald worden. Maar omdat het product [REDACTED] wordt de kans klein geacht.

Wel is er een grote kans dat er afwijkingen optreden. Het vormt juist één van de doelen van de studie. Indien een dier voortijdig uit de proef gehaald moet worden, dan zal sectie gedaan worden.

### K. Classificatie van ongerief

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

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Sectie vormt onderdeel van de studie

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

## DEC-advies

---

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer AVD210002016411
2. Titel van het project: Dierstudies ten behoeve van de markttoelating van een ██████████ bevattend diergeneesmiddel bestemd voor siervogels
3. Titel van de NTS: Dierstudies ten behoeve van de markttoelating van een diergeneesmiddel voor siervogels
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - Naam DEC: RUDEC
  - Telefoonnummer contactpersoon: ██████████, bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
  - Mailadres contactpersoon: ██████████
6. Adviestraject:
  - ontvangen door DEC: 04-02-2016
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken: 08-03-2016
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van 12-02-2016 tot 23-02-2016 en van 14-03-2016 tot 15-03-2016
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 23-02-2016 en 15-03-2016
  - advies aan CCD: 17-03-2016
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: 12-02-2016
  - Strekking van de vragen:
 

**Projectvoorstel**

-3.1. Het project betreft een formulering van een diergeneesmiddel ter bestrijding van ██████████ bij siervogels. Er wordt niet ingegaan op het werkingsmechanisme en de noodzaak hiervan. Kunnen de aanvragers (kort) ingaan op de noodzaak ██████████ te bestrijden met een nieuw middel? Is er nog niets op de markt (blijkt wel uit DAP-1)? Wat is de zin van de mededeling dat dit diergeneesmiddel in de praktijk wordt gebruikt (kennelijk zonder registratie)?

-3.3. Bestaat er geen ander middel? Waarom willen de onderzoekers juist dit toevoegen?  
-3.4.1 De commissie adviseert u de zin over de roofvogels achterwege te laten.

**Niet-technische samenvatting**

-3.1, 3.3 en 3.5 De onderzoekers weten al welke vogels zij willen gebruiken. Waarom vermelden zij dit niet in de niet-technische samenvatting?

Datum antwoord: 23-02-2016

- Strekking van de antwoorden:

**Projectvoorstel:**

3.1 en 3.3: De volgende tekst is bij 3.1 toegevoegd:

[Redacted text block]

Ten behoeve van de behandeling van [Redacted text]

[Redacted text block]

Bij gebrek aan een toegelaten bruikbaar middel worden in de praktijk niet- geregistreerde producten gebruikt. Daardoor is er wel ervaring met de actieve stof. Er zijn echter geen dossiers van samengesteld en er heeft geen beoordeling door registratieautoriteiten plaatsgevonden. Werkzaamheid en veiligheid zijn niet onderbouwd door goed uitgevoerde registratiestudies. Groot nadeel van het gebruik van niet-geregistreerde producten is dat er geen farmacovigilantie plaatsvindt.

Farmacovigilantie wordt toegepast nadat het middel op de markt komt en bestaat uit het monitoren van gebruikservaringen en waar nodig het aanpassen van de gebruiksmogelijkheden- en voorwaarden. Eén en ander wordt uitgevoerd aan de hand van meldingen van (vermoedelijke) bijwerkingen en de daarop uit te voeren evaluaties en vaststelling van eventuele acties ter voorkoming van verdere bijwerkingen, dan wel betere omgang met deze bijwerkingen.

3.4.1: Het product zal ook op de markt gebracht worden voor gebruik bij roofvogels. Daarom worden ze hier genoemd. Aan de desbetreffende zin in 3.4.1 is, ter verduidelijking, het volgende toegevoegd:

(Falconiformes, Accipitriformes en Strigiformes)

Het niet-uitvoeren van studies in deze soorten is een voorbeeld van vermindering.

**Niet-technische samenvatting:**

3.1, 3.3 en 3.

Bij 3.1 is "papegaaien" veranderd in "papegaaiachtigen"

Bij 3.3 is de tekst als volgt veranderd:

Duif: 28

Parkiet:20

Bij 3.5 is de tekst als volgt veranderd:

20 duiven (42%): licht  
20 parkieten + 8 duiven (58%): matig

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum: 14-03-2016

- Strekking van de vragen:

- **Niet-technische samenvatting:**

-4.3 De commissie vindt de laatste zin wat onhandig geformuleerd. Verwachten de onderzoekers dat een dier veel zal lijden? Misschien is het beter om aan te geven dat een dier uit de proef wordt genomen indien het meer dan het verwachte ongerief ondervindt / meer lijdt dan verwacht.

**Project Proposal:**

-Waarom kiezen de onderzoekers voor [redacted] Is de gevonden dosering in mg/kg wel de juiste indien het middel bij veel grotere of veel kleinere vogels gebruikt zal worden?

- Datum antwoord: 15-03-2016

- Strekking van de antwoorden:

- **Niet-technische samenvatting:**

-De laatste zin is als volgt gewijzigd:

Indien een dier meer lijdt, dan verwacht, dan wordt het uit de proef genomen.

**Project Proposal:**

-Zoals bij 3.1 beschreven, is op het dossier de "minor uses/minor species" regeling van toepassing. De overheid stelt voor deze diersoorten minder stringente eisen, omdat een volledig dossier conform de strikte regels onhaalbaar is.

Zoals bij 3.4.1 beschreven, wordt markttoelating aangevraagd voor veel vogelsoorten, maar

[redacted]  
Strikt volgens de wet, moet de aanvraag toegespitst worden op de diersoort waarvoor men toelating vraagt. Er dienen studies uitgevoerd te worden voor elke diersoort, zoals dat het geval is bij producten ten behoeve van bv hond, kat, varken, paard. Voor al deze vogelsoorten is dat echter onhaalbaar. Men zou per parkietensoort, per duivensoort studies moeten doen. De procedure is dus sterk vereenvoudigd. Er is gekozen voor postduif en parkiet, omdat [redacted]

[redacted]  
De te testen doseringen zijn gebaseerd op ervaring met de actieve component en literatuur. De uit te voeren studies zijn echter niet de enige studies in het op te bouwen dossier. Zoals bij 3.4.1 beschreven, wordt er ook een veldproef uitgevoerd met dezelfde doseringen (geen overdoseringen) en toedieningswijzen. Een veldproef is een proef met patiënten, waarbij werkzaamheid en veiligheid van het testproduct onder praktijkomstandigheden wordt bestudeerd. De eigenaren krijgen de testmedicatie (of placebo) mee naar huis en dienen zelf toe. Er zullen ongeveer 150 dieren worden geïncubeerd, van veel verschillende soorten en groottes (duif, roofvogel, papegaai, parkiet, sierkip). Als de dosering niet klopt bij grotere vogels, dan zal dat in de veldproef blijken. In de [redacted]

[redacted]

[redacted]

- 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 één DEC-lid uitgesloten van deelname aan de beoordeling, omdat dit lid betrokken is bij deze vergunningaanvraag. Op die manier zijn onafhankelijkheid en onpartijdigheid van de commissie gewaarborgd.

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

1. Het project is:
  - Wettelijk vereist
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'het verkrijgen van een EU markttoelating voor het te testen product, als diergeneesmiddel voor siervogels'. Het contractresearchbedrijf zal de juiste dosering, de veiligheid, en de veiligheidsmarge in het geval van overdosering onderzoeken bij bepaalde siervogels. Deze studies worden uitgevoerd in overleg met de registratieautoriteiten. De te behalen onderzoeksresultaten zullen duidelijk maken wat de juiste, veilige dosering is van dit diergeneesmiddel bij siervogels, zodat de werkzaamheid van het middel en de veiligheid voor het doeldier is gewaarborgd alvorens het middel wordt toegelaten tot de Europese markt. [REDACTED]. Het middel wordt in de praktijk al gebruikt bij vogels, maar er is nog geen geregistreerd product. De commissie acht het uitvoeren van de benodigde registratiestudies van reëel belang om de werkzaamheid en de veiligheid van dit diergeneesmiddel te waarborgen.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Het bedrijf heeft veel ervaring met dierstudies voor registraties, en werkt voor deze studie samen met een dierenarts die zich heeft gespecialiseerd in de vogeldiergeneeskunde. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over de juiste dosering en de veiligheid bij verschillende doseringen.
5. De dieren zijn niet gefokt voor dierproeven, maar worden aangekocht van duivenhouders of wanneer besmette dieren worden aangeboden op de dierenartsenpraktijk. Het is belangrijk dat het onderzoek wordt uitgevoerd bij doeldieren met dezelfde herkomst als de dieren die behandeld zullen worden met het middel. De studies worden niet uitgevoerd in een instelling

van een vergunninghouder, maar [REDACTED]. Het personeel van reguliere proefdierinstellingen heeft te weinig ervaring met deze diersoorten.

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de toediening van het geneesmiddel en de gevolgen daarvan. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde bloedafnames (3x om de 14 dagen), de [REDACTED], het verblijf in een reismand (1 uur, 4x met tussenpozen van een week), en het doden in als licht. Het ongerief als gevolg van de huisvesting in tweetallen in tentoonstellingskooitjes gedurende de looptijd van het experiment (4 weken), [REDACTED] en de overdosering van het geneesmiddel schat de commissie in als matig. De DEC is van mening dat de combinatie van al deze factoren tot maximaal matig ongerief leidt. Het cumulatief ongerief voor de vogels in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als licht voor 42% van de dieren en matig voor 58% van de 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. De onderdelen van het project die *in vitro* bestudeerd kunnen worden zijn al uitgevoerd. De veiligheid van een geneesmiddel voor een dier kan niet goed zonder proefdieren worden bestudeerd. Voor markttoelating van een geneesmiddel zijn dierproeven bij het doeldier bovendien wettelijk vereist.
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 combineren van de [REDACTED] wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De studie wordt alleen uitgevoerd bij de diersoort die het gevoeligst is voor de effecten van dit diergeneesmiddel en bij een tweede diersoort [REDACTED]. Hierdoor hoeven niet bij alle diersoorten waarvoor markttoelating wordt gevraagd deze studies gedaan te worden. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 48 vogels.
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, zodat 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. De onderzoekers kiezen niet voor groepshuisvesting (in een grote ruimte) van de parkieten, maar voor huisvesting in tweetallen. Groepshuisvesting in een grote ruimte is prettiger voor de dieren. Voor bepaalde onderdelen van het experiment is het noodzakelijk om de vogels te vangen en tijdelijk individueel te huisvesten of handelingen uit te voeren. Dit herhaaldelijk vangen levert veel ongerief voor de dieren op en kan zelfs leiden tot sterfte omdat zij zich doodvliegen tegen de wanden. Door de dieren in tentoonstellingskooitjes te huisvesten zijn zij eenvoudig te vangen. De commissie is van mening dat dit voordeel opweegt tegen het extra ongerief dat de dieren ondervinden door de huisvesting in tweetallen in tentoonstellingskooitjes, en gaat daarom akkoord met deze huisvesting. 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 de juiste dosering en veiligheid van het diergeneesmiddel voor ██████████ bij siervogels. Deze resultaten zijn nodig voor de markttoelating van dit diergeneesmiddel in de EU. De commissie acht het uitvoeren van de benodigde registratiestudies van reëel belang om de werkzaamheid en de veiligheid van dit diergeneesmiddel te waarborgen.

Tegenover dit reële belang staat het gegeven dat 42% van de dieren licht en 58% van de dieren matig ongerief zal ondervinden als gevolg van de toediening van het geneesmiddel 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.

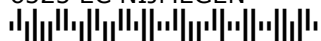


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Farma Research Animal Health B.V.

██████████  
Toernooiveld 300H

6525 EC 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  
AVD210002016411

Datum 10 februari 2016

Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ██████████

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 februari 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD210002016411. 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](http://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.

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 21000  
Naam instelling of organisatie: Farma Research Animal Health B.V.  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 09153845  
Straat en huisnummer: Toernooiveld 300H  
Postcode en plaats: 6525 EC NIJMEGEN  
IBAN: NL08RABO0113698461  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Farma Research Animal Health B.V.

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 maart 2016  
Geplande einddatum: 1 maart 2018  
Titel project: Dierstudies ten behoeve van de markttoelating van een [REDACTED] bevattend diergeneesmiddel bestemd voor siervogels  
Titel niet-technische samenvatting: Dierstudies ten behoeve van de markttoelating van een diergeneesmiddel voor siervogels  
Naam DEC: RUDEC (Radboud)  
Postadres DEC: Postbus 9101 (628), 6500 HB Nijmegen  
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

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Nijmegen  
Datum: 1 februari 2016

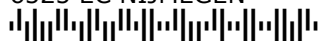


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Farma Research Animal Health B.V.

██████████  
Toernooiveld 300H

6525 EC 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  
AVD210002016411

Datum 10 februari 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 10 februari 2016

Vervaldatum: 11 maart 2016

Factuurnummer: 16700411

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD210002016411	€ 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.



## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

De aanvrager van dit project is een Contract Research Bedrijf, dat projecten uitvoert in opdracht van veterinaire farmaceutische bedrijven. Een bedrijf dat een markttoelating voor een diergeneesmiddel wil verkrijgen, dient hiertoe een registratiedossier van het middel samen te stellen, waarin productsamenstelling, veiligheid voor het dier, veiligheid voor de mens en werkzaamheid beschreven zijn. Ten behoeve van dit dossier dienen zowel in-vitro als in-vivo studies te worden uitgevoerd. De in-vivo studies betreffen oa studies met het doeldier. Dit is de diersoort waarvoor men markttoelating wil verkrijgen.

De studies dienen volgens de wettelijke richtlijnen (zie hieronder) te worden uitgevoerd met het middel zoals men het op de markt wil brengen en toegediend zoals dat later in de praktijk zal gebeuren. Het dossier wordt beoordeeld door nationale Registratieautoriteiten (bv in Nederland: College ter beoordeling Geneesmiddelen: CBG; in Engeland: Veterinary Medicines Directorate: VMD) of Europese autoriteit (European Medicines Agency: EMA) in Londen.

Dit projectvoorstel betreft studies ten behoeve van de registratie in Europa van een [REDACTED] bevattend diergeneesmiddel, bestemd voor de behandeling van [REDACTED] bij siervogels, veroorzaakt door [REDACTED]

Ten behoeve van de behandeling van [REDACTED]

Bij gebrek aan een toegelaten bruikbaar middel worden in de praktijk niet-geregistreerde producten gebruikt. Daardoor is er wel ervaring met de actieve stof. Er zijn echter geen dossiers van samengesteld en er heeft geen beoordeling door registratieautoriteiten plaatsgevonden. Werkzaamheid en veiligheid zijn niet onderbouwd door goed uitgevoerde registratiestudies.

Groot nadeel van het gebruik van niet-geregistreerde producten is dat er geen farmacovigilantie plaatsvindt. Farmacovigilantie wordt toegepast nadat het middel op de markt komt en bestaat uit het monitoren van gebruikservaringen en waar nodig het aanpassen van de gebruiksmogelijkheden- en voorwaarden. Eén en ander wordt uitgevoerd aan de hand van meldingen van (vermoedelijke) bijwerkingen en de daarop uit te voeren evaluaties en vaststelling van eventuele acties ter voorkoming van verdere bijwerkingen, dan wel betere omgang met deze bijwerkingen.

Op het dossier is de "minor uses/minor species" (MUMS) regeling van toepassing. Deze regeling is ingesteld om het mogelijk te maken dat voor weinig vóórkomende indicaties of weinig vóórkomende doeldieren, toch geregistreerde diergeneesmiddelen beschikbaar komen.

Men stelt in die gevallen minder stringente eisen.

Voor het verkrijgen van de markttoelating van het vogelproduct wordt de Decentrale Procedure (DCP) gevolgd, waarbij Engeland optreedt als Reference Member State (RMS). Bij deze procedure wordt het dossier ingediend bij de EU landen waar men toelating wil verkrijgen. Eén land (RMS) beoordeelt het dossier. De andere nemen deze beoordeling over.

Ten behoeve van het dossier [REDACTED] is uitgebreid overleg geweest met VMD (Veterinary Medicines Directorate) in Engeland. Het dossier zoals het al was ingediend, was gebaseerd op literatuur zonder in-vivo studies. De VMD eist echter toch een aantal studies met het doeldier. Met name zijn dit [REDACTED]



De studies zullen worden uitgevoerd conform de volgende Europese richtlijnen:

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]

De studies worden uitgevoerd conform de kwaliteitsrichtlijnen GLP of VICH-GCP:

- OECD Principles of Good Laboratory Practice (ENV/MC/CHEM(98)17)
- VICH Topic GL9. Guideline on good clinical practices (CVMP/VICH/595/98-FINAL)

Door de studies onder GLP of VICH-GCP uit te voeren, kunnen ze in de gehele wereld gebruikt worden ten behoeve van registratiedossiers. Het voorkomt dat studies elders herhaald moeten worden.

### 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?

Vraagstellingen:

- Wat is de juiste dosering van het diergeneesmiddel bij [REDACTED]
- Wat is [REDACTED] de veiligheid van het diergeneesmiddel en de veiligheidsmarge in het geval van overdosering?
- Wat is voor [REDACTED] de veiligheid van het diergeneesmiddel? [REDACTED]

Doel is het verkrijgen van een EU markttoelating voor het te testen product, als diergeneesmiddel voor siervogels, in het bijzonder:

- Psittaciformes (papegaaiaachtigen)
- Falconiformes (valkachtigen)
- Accipitriformes (met name havikachtigen)
- Strigiformes (uilen)
- Galliformes (hoenderachtigen)
- Columbiformes (duifachtigen)

Farma Research Animal Health heeft veel ervaring met het bepalen van de registratiestrategie en heeft daartoe regelmatig contact met registratieautoriteiten in diverse landen. De studies worden uitgevoerd op verzoek van dezelfde autoriteiten. Door dit overleg wordt voorkomen dat er later toch discussie ontstaat over de uitgevoerde studies.

Farma Research Animal Health voert zelfstandig al meer dan 10 jaar dierstudies uit tbv registraties. De dierstudies worden uitgevoerd in samenwerking met een dierenarts die zich bijna geheel gericht heeft op de vogeldiergeneeskunde. Hij behandelt al jaren vele soorten. De handelingen worden verricht door hem en door een werknemer van zijn praktijk. Ook deze werknemer is zeer ervaren wat betreft het hanteren van vogels.

Gezien de ervaring van Farma Research Animal Health en de betrokken personen zal de haalbaarheid van het project geen probleem zijn.

### 3.3 Belang

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

Het project wordt uitgevoerd in het kader van het samenstellen van een dossier ten behoeve van de EU markttoelating van het product als diergeneesmiddel voor siervogels. Deze markttoelatingsprocedure vormt een waarborging voor de werkzaamheid van het middel en voor de veiligheid voor het doeldier.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

De markttoelating wordt aangevraagd voor veel vogelsoorten. Er zullen echter bij slechts 2 soorten dierproeven worden uitgevoerd: postduif en parkiet [REDACTED]

[REDACTED] Daarnaast zal een veldstudie uitgevoerd worden met geïnfecteerde dieren die op de dierenartsenpraktijk worden aangeboden. Deze veldproef valt buiten de projectaanvraag.

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

[REDACTED] dient de veiligheid ook dmv dierproeven te worden onderzocht. Dit gebeurt op 2 manieren:

- Onderzoek naar veiligheid bij lage doseringen [REDACTED]
- Onderzoek naar veiligheid bij hoge doseringen [REDACTED]

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.

Zie antwoord bij vraag 3.4.2.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	██████████████████ studie Duif
2	██████████████████ Parkiet
3	██████████████ studie Duif
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Farma Research Animal Health B.V.

Toernooiveld 300H  
6525EC Nijmegen

**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  
AVD210002016411

**Uw referentie**

**Bijlagen**  
1

Datum 7 april 2016

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 2 februari 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Dierstudies ten behoeve van de markttoelating van een [REDACTED] bevattend diergeneesmiddel bestemd voor siervogels" met aanvraagnummer AVD210002016411. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 21 maart 2016 heeft u ons een aangepaste versie van het projectvoorstel en de NTS toegezonden. Deze documenten zijn herzien naar aanleiding van vragen van de DEC.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). U kunt met uw project "Dierstudies ten behoeve van de markttoelating van een [REDACTED] bevattend diergeneesmiddel bestemd voor siervogels" starten. De vergunning wordt afgegeven van 7 april 2016 tot en met 1 maart 2018. De looptijd wijkt af van uw aanvraag omdat de startdatum in het verleden ligt.

U beschrijft in uw aanvraag dat de dieren op een andere locatie worden gehuisvest. U beschrijft dat u de locatie aanmeldt bij de NVWA en ontheffing aanvraagt voor de medewerkers van de betreffende locatie die verantwoordelijk zijn voor de verzorging van de dieren. Dit is conform artikel 6 lid 2 van de Dierproevenregeling 2014 dit artikel betreft wettelijke eisen ten aanzien van opleiding.

Wij hebben dit bij de NVWA gemeld en u dient te beschikken over deze ontheffing voor u aanvangt met de uitvoer van dit project.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie RUDEC. Dit advies is opgesteld op 17 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

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

**Datum**  
7 april 2016

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD210002016411

### **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.

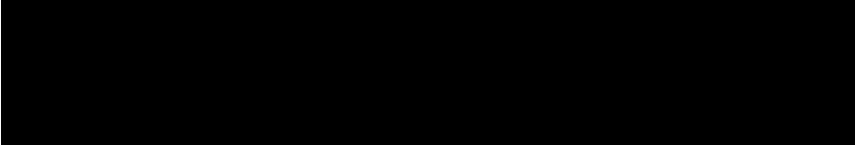
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

  
Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

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

### **Bijlagen**

- Vergunning

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Farma Research Animal Health B.V.  
Adres: Toernooiveld 300H  
Postcode en woonplaats: 6525 EC NIJMEGEN  
Deelnemersnummer: 21000

deze projectvergunning voor het tijdvak 7 april 2016 tot en met 1 maart 2018, voor het project "Dierstudies ten behoeve van de markttoelating van een [REDACTED] bevattend diergeneesmiddel bestemd voor siervogels" met aanvraagnummer AVD210002016411, volgens advies van Dierexperimentencommissie RUDEC (Radboud). De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]. Voor de uitvoering van het project is IvD voorzitter verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 2 februari 2016
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 21 maart 2016;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 21 maart 2016;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 17 maart 2016, ontvangen op 18 maart 2016;
  - d. De aanvullingen zoals ontvangen bij digitale indiening op 21 maart 2016.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
[REDACTED] Duif	Andere vogels (andere Aves) / postduiven	20	Licht
[REDACTED] Parkiet	Andere vogels (andere Aves) / parkiet	20	Matig
[REDACTED] studie Duif	Andere vogels (andere Aves) / postduiven	8	Matig

Aan deze vergunning zijn geen aanvullende voorwaarden verbonden

## **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 blijvende schade

**Datum**

7 april 2016

**Onze referentie**Aanvraagnummer  
AVD210002016411

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.

**Locatie**

De vergunning wordt verleend voor een project waarbij dierproeven geheel of gedeeltelijk worden verricht buiten een inrichting van een gebruiker (artikel 10g van de wet).



Inventaris Wob-verzoek W16-22S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2016412</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
10	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
11	Verzoek reactie DEC				x		x	x	
12	Reactie DEC				x		x	x	
13	Advies CCD		x						x
14	Beschikking en vergunning				x		x	x	



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?  
*Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.*

Ja > Vul uw deelnemernummer in 90500  
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

AVD go 500 2016320 412

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

Naam instelling of organisatie BioXpert B.V.

Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde

KvK-nummer 54838134

- 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 Nistelrooise Baan 3

Postbus

Postcode en plaats 5374RE Schaijk

IBAN NL72RABO0183605888

Tenaamstelling van het rekeningnummer BioXpert

- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters  Dhr.  Mw.

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

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

(Titel) Naam en voorletters  Dhr.  Mw.

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- |                             |            |   |
|-----------------------------|------------|---|
| (Titel) Naam en voorletters | [Redacted] | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     | [Redacted] |   |
| Afdeling                    | [Redacted] |   |
| Telefoonnummer              | [Redacted] |   |
| E-mailadres                 | [Redacted] |   |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het Ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag
- Nee

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |               |
|------------|---------------|
| Startdatum | 1 - 3 - 2016  |
| Einddatum  | 28 - 2 - 2021 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Uittesten van veiligheid van levend verzwakte influenza vaccins in muizen en fretten
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Veiligheid van levend verzwakte griepvaccins in muizen en fretten.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |            |
|-------------|------------|
| Naam DEC    | [Redacted] |
| Postadres   | [Redacted] |
| E-mailadres | [Redacted] |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1441 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*  
 Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

- Projectvoorstel  
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

- Melding Machtiging

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

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

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

Functie

Plaats

Schaijk

Datum

2-3-2016

Handtekening



## Format

### Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

In het kader van vaccin ontwikkeling tegen influenza biedt de aanvrager van dit projectvoorstel verschillende preklinische modellen aan om de veiligheid van deze vaccins uit te testen. Deze modellen zijn door de aanvrager opgezet en kunnen gebruikt worden om preparaten verschaft door derden (in het algemeen farmaceutische bedrijven) uit te testen.

De antigeniciteit van influenza virussen verandert in de tijd significant, een proces beter bekend als antigene drift. Als gevolg hiervan dient het jaarlijkse influenza vaccin regelmatig aangepast te worden om bescherming te kunnen blijven bieden tijdens de elk jaar terugkerende epidemie door de zogenoemde seizoensvirussen. Daarnaast is er een constante dreiging van het uitbreken van een humane influenza pandemie. Deze pandemieën worden veroorzaakt door influenza virussen die tot dan toe nog niet voorgekomen zijn in de humane populatie (antigene shift) en waartegen geen (of zeer beperkte) immunologische respons bestaat. Als gevolg daarvan ondervinden personen geïnfecteerd met dergelijke pandemische virussen, maar ook personen behorend tot risico groepen geïnfecteerd met seizoensvirussen, een meer ernstig ziektebeeld resulterend in een hoge mortaliteit. Voor virussen behorend tot beide groepen (seizoens en pandemische virussen) is constant onderzoek nodig om de humane populatie voldoende bescherming te kunnen bieden.

Tegen zowel laag pathogene seizoensvirussen als hoog pathogene (mogelijk pandemische) virussen zijn op dit moment verschillende vaccins beschikbaar welke in de meeste gevallen gebruik maken van een geïnactiveerd influenza preparaat dat in de afwezigheid (seizoensvaccinatie) of aanwezigheid (pandemische vaccinatie) van een adjuvant gegeven worden. De keuze om wel of niet een adjuvant toe te voegen hangt af van de immunologische achtergrond van de te vaccineren personen. Indien reeds een influenza-specifieke immunologische achtergrond aanwezig is, kan volstaan worden te vaccineren zonder adjuvant. Echter, bij een immunologisch naïeve populatie dient een adjuvant toegevoegd te worden om bescherming te kunnen garanderen. Een alternatief voor geïnactiveerd vaccin al dan niet met adjuvant is het gebruik van een levend verzwakt influenza vaccin (LAIV: life-attenuated influenza vaccin). Een dergelijk vaccin geeft een gelimiteerde infectie waarbij de virale eiwitten in de gastheercel tot expressie worden gebracht. Door deze transcriptie is een brede presentatie van de virale eiwitten aan het immuunsysteem van de gastheer en wordt er een efficiëntere immuunrespons opgewekt. Dit blijkt uit het feit dat bij vaccinatie met een dergelijk LAIV een enkele vaccinatie benodigd is om te komen tot een effectieve immuunrespons, terwijl bijvoorbeeld geïnactiveerd antigeen in combinatie met adjuvant twee keer toegediend moet worden. Op dit moment is er voor influenza slechts één product op basis van LAIV, namelijk Flumist, waarvoor toestemming is gegeven voor toepassing in de mens. Dit wordt op grote schaal in de Verenigde Staten toegepast. Voor de vrijgifte testen van dergelijke LAIVs is door de regelgevende autoriteiten (EMA en WHO) een aantal kwalitatieve testen opgelegd. In deze testen is het van belang om de donor virussen te testen, de zogenaamde Master Donor Viruses (MDVs), in zowel muizen als fretten. Deze virussen vormen de basis waaruit de vaccin batch geproduceerd zal worden.

Aangezien de fret zeer gevoelig is voor infectie met wild-type (niet laboratorium-geadapteerde en klinisch relevante) influenza virussen, worden fretten al jaren gebruikt voor het maken van influenza-specifiek antiserum. Ondanks het feit dat het fretten model de eerste keuze is in het kader van influenza onderzoek, is ook de muis voor een aantal experimenten nodig. Zeker in het geval van neurovirulentie (1 van de vereisten voorgeschreven door de EMA) is de beschikbaarheid van een muis-geadapteerd virus dat in staat is om te repliceren in de hersenen na intranasale infectie een belangrijke factor voor de keuze van juist het muizenmodel. Dit neurovirulente virus kan ingezet worden als positieve controle in de uit te voeren experimenten in muizen.

De vrijgifte criteria waaraan bovengenoemde LAIVs moeten voldoen zijn vastgelegd in verschillende regulatoire documenten en moeten voldoen aan de volgende eisen:

1. Afwezigheid van neurovirulentie (zoals voorgeschreven door de EMA)
2. Bevestiging van het verzwakte fenotype in de longen (zoals voorgeschreven door de WHO)

Ad 1 (dierproef 1 en 2). Alhoewel het maar zelden voorkomt, kunnen influenza virus infecties geassocieerd worden met neurologische aandoeningen. De uitkomst van deze aandoeningen zijn zeer verschillend en kunnen leiden tot volledige genezing, maar ook tot blijvende schade en zelfs de dood.

Deze neurologische verschijnselen zijn zeer zeldzaam, maar ondanks dat moeten de MDVs van levend verzwakte influenza virus vaccins (zoals LAIV) getest worden op de afwezigheid van neurovirulente eigenschappen in het muizenmodel (zie EMEA richtlijnen EMEA/CPMP/BWP/2289/01, Appendix 1a en 1b en Voeten et al, Appendix 3).

Ad 2 (dierproef 3). Volgens de richtlijnen van de WHO zoals vermeld in de "WHO Expert Committee on Biological Standardization" is het voorgeschreven dat de MDVs van elk nieuw kandidaat levend verzwakt vaccin uitgetest moet worden. In dit experiment dient het verzwakte fenotype van de MDVs bevestigd te worden in de longen van fretten voordat de distributie van het betreffende vaccin in werking kan worden gezet (zie Annex 5 human pandemic influenza, Appendix 2).

Beide hierboven omschreven testen bij Ad 1 en Ad 2 betreffen kwalitatieve testen. In deze experimenten zal met de meest gevoelige detectie technieken aangetoond moeten worden dat de betreffende MDVs geen replicatie vertonen in de hersenen (zoals beschreven bij Ad 1) of in de lage luchtwegen (zoals beschreven bij Ad 2).

### 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?

De algemene doelstelling van het project is het uittesten van de veiligheid van levend verzwakte influenza vaccins door middel van een kwalitatieve bepaling:

1. Aantonen van de afwezigheid van replicatie in de hersenen (neurovirulentie testen) waarbij de primaire uitleesparameter de afwezigheid zal zijn van replicatie in de hersenen van muizen (in deze experimenten zal een influenza virus waarvan bewezen is dat het repliceert in de hersenen van muizen dienen als positieve controle).
2. het bevestigen van het levend verzwakte fenotype waarbij de primaire uitleesparameter de afwezigheid van virale replicatie in de longen van fretten is (in deze experimenten zal het corresponderende wildtype influenza virus dat wel repliceert in de longen dienen als positieve controle).

Dit soort studies worden door de aanvrager uitgevoerd om te kunnen voldoen aan de vraag van derden om de veiligheid van levend verzwakte influenza vaccins uit te testen en om advies uit te brengen richting regelgevende instanties (de WHO en de EMEA). Vanwege de grote expertise van de aanvrager op het gebied van influenza en haar relevante in vivo modellen hebben dergelijke studies ook geleid tot publicatie in peer-reviewed tijdschriften. Deze expertise leidt tot een toename van de kwaliteit van het te gebruiken model en het ontwikkeltraject van de betreffende interventie strategie.

### 3.3 Belang

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

Seizoensinfluenza treft jaarlijks tussen de 5% en 10% van de volwassenen en zo'n 20% tot 30% van de kinderen. De ontwikkeling van griep kan resulteren in hospitalisatie en sterfte in vooral de zogenaamde risicogroepen (baby's, jonge kinderen, bejaarden en chronisch zieken). Geschat wordt dat de jaarlijkse epidemieën wereldwijd 3 tot 5 miljoen ernstig zieken leidt en tussen de 250.000 en 500.000 sterftegevallen. In ontwikkelde landen vallen de meeste doden bij mensen ouder dan 65 jaar. Epidemieën kunnen tevens leiden tot absentie van arbeiders en scholieren en daarmee economische schade veroorzaken (WHO Influenza fact sheet, 2014).

Influenza pandemieën zijn onvoorspelbaar maar terugkerende gebeurtenissen die wereldwijd grote gezondheids-, economische en maatschappelijke gevolgen hebben. Hiervoor zijn meerdere parallelle factoren verantwoordelijk: een (mogelijk) pandemische virus dat in staat is om blijvende mens-op-mens

transmissie te bewerkstelligen waarbij het een virus betreft waarvoor geen of nauwelijks immuniteit tegen is opgebouwd in de populatie. Door de wereldwijde toename in handel en reismogelijkheden kan een lokale epidemie snel omslaan naar een infectie op pandemische schaal waarbij weinig tijd beschikbaar is om doeltreffende maatregelen te treffen vanuit het oogpunt van de volksgezondheid. Daarnaast kan niet uitgesloten worden dat influenzavirussen uit andere bronnen zoals varkens, ook pandemisch potentieel hebben (WHO Avian Influenza fact sheet, 2014).

De resultaten verkregen in de dierproeven beschreven in dit project voorstel zullen gebruikt worden om veiligheid te garanderen van levend verzwakte influenza vaccins en de betreffende levend verzwakte influenza vaccins vrij te geven voor humaan gebruik. Vanwege het hoog immunogene karakter van deze levend verzwakte vaccins kunnen deze een bijdrage leveren in het voorkomen van infectie en de gevolgen van de infectie (ziekte) van zowel seizoensvirussen als ook pandemische virussen

### **3.4 Onderzoeksstrategie**

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

Het doel van deze projectaanvraag is het uitvoeren van wettelijk vereiste veiligheidstesten voor het op de markt kunnen brengen van nieuwe levend verzwakte vaccins tegen influenza.

Levend verzwakte influenza vaccins dienen getest te worden op zowel werkzaamheid (immunogeniciteit en effectiviteit) en veiligheid voor humaan gebruik. Als eerste zal bepaald worden of een vaccin voldoende immunogeen is, m.a.w. kan het een adequate immuunrespons induceren. Zodra dit (al dan niet uitgevoerd door de aanvrager of anders gecommuniceerd door de derde partij met de aanvrager) aangetoond is, is het noodzakelijk dat de veiligheid van de vaccins bestudeerd wordt. Aangezien het vaccin uiteindelijk gebruikt zal worden in mensen, kan de veiligheid alleen uitgetest worden in de voor het preparaat en voor de vraagstelling geschikte diermodellen, zoals voorgeschreven door de verschillende regelgevende instanties. In het geval van replicerende (maar verzwakte) vaccins tegen influenza is vastgesteld door EMEA en WHO dat het vaccin na inoculatie niet mag repliceren in de hersenen (zie dierproeven 1 en 2 opgelegd door de EMEA) en dient aangetoond te worden dat het vaccin niet kan repliceren in de longen (zie dierproef 3 opgelegd door de WHO). Vrijgifte van het betreffende levend verzwakte influenza vaccin hangt af van de resultaten van beide experimenten. Indien in 1 van de 2 experimenten replicatie aangetoond wordt (in de hersenen van muizen bij dierproef 2 of in de longen van fretten bij dierproef 3) zal het betreffende levend verzwakte influenza vaccin niet vrijgegeven worden.

De volgorde van bovenstaande testen (afwezigheid van replicatie in de hersenen van muizen of in de longen van fretten) is in het vrijgifte proces niet van belang. Echter, indien in 1 van de 2 experimenten wel degelijk replicatie wordt aangetoond, zal het betreffende levend verzwakte influenza vaccin niet vrijgegeven kunnen worden.

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

##### **Ad 1. Kan het levend verzwakte influenza vaccin repliceren in de hersenen van muizen:**

###### Experiment 1: Dosis bepaling/bevestiging bewezen neurovirulent influenza virus

In dit experiment zal de optimale dosis van het bewezen neurovirulente virus (positieve controle) bevestigd worden. Dit virus is reeds beschreven in een wetenschappelijke publicatie waarin aangetoond is dat bij de door de auteurs gebruikte dosering en route van infectie het virus kan repliceren in de hersenen. Aangezien het betreffende virus opnieuw opgegroeid is, dient bevestigd te worden dat de nieuwe virusstock dezelfde biologische eigenschappen heeft als beschreven in de publicatie. Hiertoe zullen muizen intranasaal geïnfecteerd worden met 1 of verschillende doses van het virus en vervolgd worden voor 3 en 5 dagen na infectie. Dagelijks zullen alle dieren geobserveerd worden en klinische verschijnselen en virale load (op dag 3, 5 of bij vroegtijdige uitval) in de hersenen zal vergeleken worden met de reeds bekende dosis of tussen de verschillende doses op verschillende tijdstippen. De optimale dosis zal gebruikt worden in het opvolgende experiment.



### Experiment 2: Neurovirulentie in muizen

In dit experiment zullen muizen via de intranasale route geïnfecteerd worden met zowel het bewezen neurovirulente influenza virus zoals uitgetest in experiment 1, maar ook de betreffende MDVs, zoals omschreven door de EMEA. Dit experiment is om aan te tonen of de MDVs, welke zullen fungeren voor het genereren van het levend verzwakte influenza vaccin (LAIV: life attenuated influenza vaccine), niet kunnen repliceren in de hersenen volgens een kwalitatieve bepaling met de meest gevoelige methode om influenza virus aan te kunnen tonen. Dit experiment is opgedeeld in twee fasen zoals omschreven in de richtlijnen van de EMEA. In het kader van vermindering, zal in de eerste fase per virus (positieve controle en de verschillende MDVs) een beperkt aantal muizen geïnfecteerd worden en de replicatie in de luchtwegen en/of het brein bestudeerd worden. De replicatie in de luchtwegen dient als controle of de dieren productief geïnfecteerd zijn. Indien replicatie in het brein aanwezig is, zal fase 2 niet uitgevoerd worden (NO GO). Indien geen replicatie wordt gezien, zullen per virus extra dieren geïnfecteerd worden om te kijken naar dezelfde variabelen (GO).

#### **Ad 2. Kan het levend verzwakte influenza vaccin repliceren in de longen:**

Om te bepalen of de MDVs welke gebruikt zullen worden voor het genereren van de LAIVs nog kunnen repliceren in de longen zullen fretten intranasaal geïnfecteerd worden met een positieve controle (replicierend influenza virus), negatieve control (PBS) en de verschillende MDVs. Voorafgaand aan de studie zullen de dieren voorzien worden van een temperatuur logger en op gezette tijden na infectie worden de dieren bemonsterd uit de luchtwegen en geëuthanaseerd voor het bepalen van replicatie in verschillende organen waaronder de longen. Deze experimenten hebben een kwalitatief karakter waarbij met de meest gevoelige methode zal worden geprobeerd om influenza virus aan te tonen. In tegenstelling tot Ad 1 zijn positieve controles reeds beschikbaar en dient dit niet op voorhand uitgetest te worden.

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.

Voor het testen van de veiligheid van levend verzwakte influenza vaccins dienen de vaccins te voldoen aan de volgende criteria:

1. afwezigheid van replicatie in de hersenen van muizen (dierproef 2)
2. afwezigheid van replicatie in de longen van fretten (dierproef 3)

Niet noodzakelijkerwijs dienen de experimenten ter bevestiging van de veiligheid van levend verzwakte influenza vaccins in bovenstaande volgorde uitgevoerd te worden. Echter indien in 1 van de 2 experimenten wel degelijk replicatie aangetoond worden in dan wel de hersenen dan wel de luchtwegen, zal het andere experiment niet uitgevoerd worden. Daarnaast zal dierproef 2 gefaseerd uitgevoerd worden. Als eerste zal een beperkt aantal dieren geïnfecteerd worden en bij bewezen replicatie in de hersenen zal dit niet vervolgd worden in een groter aantal dieren (NO GO). Indien in de eerste dieren geen replicatie in de hersenen geobserveerd wordt (GO), zal een groter aantal dieren geïnfecteerd worden om de power te verhogen. Daarnaast is voorgeschreven door de WHO dat ook de replicatie in de luchtwegen van fretten bestudeerd dient te worden. Zodra voldaan is aan beide voorwaarden: afwezigheid van replicatie in de hersenen EN afwezigheid van replicatie in de longen kan het betreffende preparaat of de betreffende preparaten bestudeerd worden op werkzaamheid tegen infectie met influenza virus.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Dosis bepaling/bevestiging van bewezen neurovirulent influenza virus in muizen
2	Veiligheid van levend verzwakt influenza vaccin: Neurovirulentie in muizen
3	Veiligheid van levend verzwakt influenza vaccin: Bevestiging van verzwakte fenotype in de longen van fretten
4	
5	
6	

7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	90500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	1	Dosis bepaling/bevestiging van bewezen neurovirulent influenza virus in muizen

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

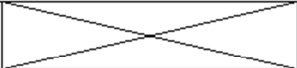
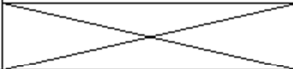
Influenza infecties kunnen geassocieerd worden met verschillende neurologische aandoeningen. Gevolgen van deze aandoeningen zijn zeer variabel, waarbij de patiënt kan genezen maar ook kan overlijden. Ondanks het feit dat neurovirulentie nauwelijks wordt gerapporteerd blijft het een mogelijk gevaar bij het gebruik van levend verzwakte influenza virus vaccins. Dit is dan ook de reden dat de regelgevende instanties oplegt dat er wordt getest op de afwezigheid van neurovirulentie volgens de standaard EMEA richtlijnen voor levend verzwakte influenza virus vaccins (EMEA/CPMP/BWP/2289/01).

In dit deel van het onderzoek wordt er eerst gekeken naar de optimale infectie dosis van een positieve controle influenza virus in de muis. Dit positieve controle virus zal vervolgens gebruikt worden in de dierstudie beschreven in dierproef 2, waarbij de afwezigheid van replicatie in de hersenen van muizen aangetoond dient te worden. Het betreffende virus is reeds geadapteerd aan het muizenbrein wat infectie van het brein na intranasale toediening zal garanderen. Om dit aan te tonen zullen de muizen geïnfecteerd worden via de intranasale route en zullen brein en respiratoir weefsel getest worden op de aanwezigheid van influenza virus. Aanwezigheid van virus in respiratoir weefsel zal de positieve controle zijn binnen het experiment en toont aan dat intranasale infectie goed verlopen is. Primaire uitleesparameter in het experiment zal de detectie zijn van virus in de hersenen.

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 opzet van dit soort experimenten inclusief de groepsgroottes is bepaald in de richtlijnen welke omschreven zijn in EMEA/CPMP/BWP/2289/01 en vervolgens gepubliceerd door Voeten et al (Arch Virol 2010).

Nadat de dieren zijn aangekomen in de faciliteit zullen ze een acclimatisatie periode hebben van minimaal 1 week. Dieren worden voorzien van een oorknip voor identificatie, gewogen en er wordt bloed afgenomen via de wangprik (~100ul) voor serum. Deze hoeveelheid serum (~50ul) is voldoende om in het geval van onverwachte resultaten op basis van serologie uit te sluiten dat de dieren op voorhand een immunologische respons hadden tegen influenza. Op dag 0 zullen de dieren geïnfecteerd worden via de intranasale route met 50ul virus onder isofluraan sedatie (3-4%). Na infectie zullen de dieren dagelijks gewogen worden en klinische symptomen gescoord worden. Op gezette tijden na infectie (dag 3 en dag 5) of als het betreffende dier het humane eindpunt bereikt worden dieren geëuthanaseerd voor het bepalen van de virale load in respiratoir en hersen weefsel. Dag 3 na infectie dient ter controle op succesvolle inoculatie waarbij replicatie aangetoond dient te worden in respiratoir weefsel, terwijl dag 5 na infectie gekozen is om replicatie aan te tonen in hersen weefsel. Ter informatie staat hieronder een voorbeeld van de setup voor een dergelijke studie waarin 1 virus uitgetest zal worden (hierbij staat dX voor dag 3 en dY voor dag 5):

		<i>Infection</i>				
Group	No/Group	d -7	d -1	d0	dX	dY
1	5	<i>Entry</i>	Marking and blood	Intranasal inoculation <b>Positive control with 50 µl</b>	Sacrifice and harvesting of tissue	
2	5					
HOUSING		NORMAL	DM-II			

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

Voor het onderzoek wordt er gewerkt volgens de standaard EMEA richtlijnen (EMEA/CPMP/BWP/2289/01). Verder is gebleken uit eerder onderzoek, gepubliceerd door Voeten et al, dat met een beperkt aantal van 5 dieren per tijdstip aangetoond kan worden dat het betreffende virus ingezet kan worden als positieve controle in het vervolg experiment zoals beschreven in bijlage 2 met de corresponderende aantal dieren per groep. Power analyse is binnen deze dierproef niet mogelijk aangezien geen groepen binnen de dierproef met elkaar vergeleken worden, daarentegen is gekozen voor een zeer beperkt aantal dieren per tijdstip om aan te tonen dat de positieve controle als zodanig ingezet kan worden in de dierproeven zoals beschreven in bijlage 2.

## B. De dieren

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

**Diersoort:** muizen (Swiss), vrouwelijk of mannelijk van 4-6 weken oud

In tegenstelling tot andere diersoorten (zoals fretten of NHP), is er een influenza virus beschikbaar dat geadapteerd is aan replicatie in de hersenen van muizen. De beschikbaarheid van een dergelijk virus biedt de mogelijkheid om zonder voorwerk (in het kader van vermindering) gebruik te maken van deze positieve controle. Daarnaast heeft reeds gepubliceerd onderzoek aangetoond dat replicatie in de hersenen in deze muizenstam van dit geslacht en leeftijd aangetoond kan worden (Voeten et al). De keuze van het geslacht is gebaseerd op de vervolg experimenten zoals omschreven in dierproef 2, in dierproef 2 is dan ook een rechtvaardiging gegeven voor het te gebruiken geslacht.

**Herkomst:** geregistreerde proefdierfokker

**Geschatte aantal:** 110 dieren in 5 jaar

In eerdere reeds gepubliceerde resultaten (Voeten et al Archives of Virology 2010) is aangetoond dat dit virus kan repliceren in de hersenen van alle geïnfecteerde muizen bij de gekozen dosis en route van infectie. Aangezien infectie en replicatie in de hersenen zal dienen als positieve controle in toekomstige experimenten, dienen alle geïnfecteerde dieren positief te zijn. Zoals beschreven bij punt A zijn 5 dieren per tijdstip (ofwel 10 dieren per groep) benodigd om aan te tonen dat het virus bij de gekozen dosering kan dienen als positieve controle.

Er wordt verwacht om een dergelijke studie maximaal 1 keer per jaar uit te voeren voor een virus waar de dosering reeds van bekend is (1 uit te testen dosis), dus een totaal aantal van 5 jaar x 10 muizen = 50

muizen. Echter, indien er voldoende onderbouwing is dat het betreffende virus in vivo nog presteert zoals eerder bevonden, zal dit experiment niet nogmaals uitgevoerd worden. 50 muizen in 5 jaar is dus het maximale aantal, maar getracht wordt om hiervoor minder muizen te gebruiken.

Indien de reeds bekende dosis niet leidt tot 100% infectie in de hersenen, zal een dose-finding uitgevoerd worden om te bepalen wat de benodigde dosis moet zijn (dit kan bijvoorbeeld het geval zijn na opnieuw opgroeien van het virus). Op basis van onze ervaring is de verwachting om in de 5 jaar dit maximaal 2 keer uit te zullen moeten testen en waar dan 3 verschillende doseringen uitgetest zullen moeten worden, dus een totaal van 2 maal x 3 doseringen x 10 muizen = 60 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.

**Vervanging:** deze experimenten zijn opgezet om te bepalen of het positieve controle virus in de gekozen dosering kan repliceren in het brein van de muis na intranasale toediening. Dit is in vitro niet na te bootsen.

**Vermindering:** de groepsgrootte is dusdanig tot stand gekomen dat met het kleinst mogelijke aantal gekomen kan worden tot significante resultaten (zie ook B "geschatte aantal").

**Verfijning:** Meest invasieve behandelingen zullen uitgevoerd worden onder sedatie en dieren worden dagelijks geobserveerd.

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.

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt worden door het feit dat dieren gehuisvest zullen worden in HEPA gefilterde IVC bakken en handelingen zullen uitgevoerd worden in een veiligheidskabinet. Afval (bedding, kadavers en andere materialen gebruikt in de studie) zullen worden aangeboden voor destructie en/of worden gesteriliseerd. De gehele studie wordt uitgevoerd onder BSL II ingeperkte condities.

## 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.

n.v.t., echter dienen de experimenten uitgevoerd onder dierproef 1 als bevestiging of de positieve controle, zoals meegenomen in de wettelijk vereiste dierproeven uitgevoerd onder dierproef 2, volstaat. Van duplicatie zal dus geen sprake zijn, echter zal een tweede experiment onder dierproef 1 alleen uitgevoerd worden indien onzeker is of de positieve controle nog presteert zoals deze zou moeten presteren.

## 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?

(de inschatting is dat op basis van ervaring in eerdere dierproeven met de hier uit te testen virus stam, test preparaten en dosis/doses er geen pijn verwacht wordt in de dieren als gevolg van de infectie en vervolgens de replicatie in de luchtwegen/hersenen) Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

#### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Andere verschijnselen die de dieren kunnen vertonen, maar die niet gepaard gaan met pijn zijn:

- zijn algemene verschijnselen: opgezette vacht, gebogen postuur en verminderd actief bij stimulatie
- respiratoire verschijnselen: een verhoogde ademhalingsfrequentie (deze zal bij verergering overgaan in stokkende/schokkende ademhaling)
- neurologische verschijnselen: verstoorde locomotie zoals een instabiele gang (deze zal bij verergering overgaan in verlamming (parese en paralyse)).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

replicatie in de luchtwegen (respiratoire verschijnselen) of de hersenen (neurologische verschijnselen).

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

De inschatting is dat de dieren binnen de studie geen pijn zullen ondervinden (zie ook H). Daarnaast is het zo dat analgetica in het algemeen naast pijnstillende ook een ontstekingsremmende werking hebben en kunnen dus interfereren in de studie. Daarom is per definitie het gebruik van analgetica niet mogelijk in deze experimenten tijdens de infectie fase. Indien de conditie van een dier dusdanig is dat het niet meer

zelfstandig kan eten, zal er naast voer en water via de normale weg ook (bevochtigd) voer aangeboden worden op de bodem van de bak op een geschikte ondergrond (bv. petrischaal).

### 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.

De dieren zullen dagelijks geobserveerd worden en klinische scores (zoals beschreven in de publicatie van Voeten et al.) worden genoteerd. Bij matig ongerief (zie hieronder de inschaling van de ongerief klassen) zal het betreffende dier uit de studie worden genomen. Deze klinische ongerief classificaties zijn:

Licht: 2 algemene symptomen\*

Matig: 3 algemene symptomen of neurologische verschijnselen\*

Ernstig: gewichtsverlies van >15%

\* algemene symptomen: opgezette vacht, gebogen postuur en verminderd actief

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

Op basis van gepubliceerde data is de verwachting dat 50% van de dieren licht en 50% van de dieren matig ongerief zullen ondervinden. Ernstig ongerief door het vertonen van gewichtsverlies van >15% wordt niet verwacht vanwege de korte tijdsduur van het experiment (5 dagen) en dit is tevens gebaseerd op eigen ervaringen met influenza virus in muizen. Daarnaast is het zo dat respiratoire symptomen i.v.m. de korte looptijd van de studie niet verwacht worden

### K. Classificatie van ongerief

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

Het cumulatieve ongerief voor de gehele studie wordt ingeschaald op "matig".

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Om te zien of het virus neurovirulent is zullen de hersenen moeten worden verwijderd en zullen de virus titers worden bepaald. Daarnaast fungeren de virale titers in het respiratoir weefsel als positieve controle voor infectie. Dergelijke bemonsteringen zijn niet mogelijk uit een intact dier.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- |     |  |            |  |
|-----|--|------------|--|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.           | 90500      |  |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | BioXpert   |  |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | Volgnummer | Type dierproef   |
|     |  | 2          | Veiligheid van influenza vaccin: Neurovirulentie in 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.

Het testen van de neurovirulentie van MDVs welke als basis dienen voor life-attenuated influenza vaccines (LAIV) is een wettelijke vereiste. Na het bepalen van de virus dosis van de positieve controle in het voorgaande experiment (volgnummer 1) zal de afwezigheid van neurovirulentie getest worden van de betreffende master donor virussen (MDVs) en als positieve controle zal het positieve controle virus meegenomen worden. Deze MDVs zullen fungeren als basis voor het levend verzwakte influenza vaccin en de afwezigheid van neurovirulentie is 1 van de vereisten van een dergelijk vaccin. De primaire uitleesparameter in dit experiment is de afwezigheid van virusreplicatie in de hersenen waarbij de testen om dit aan te tonen een kwalitatief karakter hebben. En als positieve controle zal na infectie met het positieve controle virus replicatie aangetoond moeten worden in de hersenen van 100% van de muizen. Binnen het experiment zal een GO/NO GO beslissing ingebouwd worden. In het kader van vermindering zal met een beperkt aantal dieren het eerste deel van het experiment uitgevoerd worden. Ten eerste zal virus detectie in de luchtwegen van deze eerste dieren dienen om aan te tonen dat de dieren productief geïnfecteerd zijn geweest. Daarnaast, indien in de eerste 10 dieren al neurologische verschijnselen worden gezien en/of virus wordt gedetecteerd in de hersenen op dag 3 na infectie, zal het resterende aantal (30) niet gebruikt worden (NO GO). Indien bovenstaande niet wordt gevonden, zal het resterende aantal volgens hetzelfde protocol (dosering en route van infectie) wel gebruikt worden om met grotere zekerheid aan te tonen dat de MDVs niet kunnen repliceren in de hersenen op dag 5 na infectie (GO). Deze dag 5 (in tegenstelling tot dag 3 waarbij de replicatie in de luchtwegen piekt) is de meest optimale dag om de replicatie in de hersenen te bestuderen.

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 opzet van dit soort experimenten inclusief de groepsgrootten is bepaald in de richtlijnen welke omschreven zijn in EMEA/CPMP/BWP/2289/01 en vervolgens gepubliceerd door Voeten et al (Arch Virol 2010).

Nadat de dieren zijn aangekomen binnen de faciliteit zullen ze een acclimatisatie periode hebben van minimaal 1 week. Dieren worden voorzien van een oorknip voor identificatie, gewogen en er wordt bloed afgenomen via de wangprik (~100ul) voor serum. Deze hoeveelheid serum (~50ul) is voldoende om in het geval van onverwachte resultaten op basis van serologie uit te sluiten dat de dieren op voorhand een immunologische respons hadden tegen influenza. Op dag 0 zullen de dieren geïnfecteerd worden via de intranasale route met 50ul van het positieve controle virus of test preparaat (MDV) onder isofluraan sedatie (3-4%). Na infectie zullen de dieren dagelijks gewogen worden en klinische symptomen gescoord worden. Op een vastgesteld tijdstip na infectie (dag 3 of dag 5) of als het betreffende dier het humane eindpunt bereikt worden de dieren geëuthanaseerd voor het bepalen van de virale load in respiratoir en hersen weefsel. Indien geen neurologische verschijnselen of virus in de hersenen worden gevonden in de eerste serie dieren, zal een tweede serie met een andere looptijd ingezet worden. Ter informatie staat hieronder een voorbeeld van de setup voor een dergelijke studie waarin 2 test preparaten uitgetest zullen worden (hierbij staat dX voor dag 3 en dY voor dag 5):

Group		No./Group	Infection			
		d -7	d -1	d0	dX	dY
1	10	Entry	Marking	Intranasal inoculation <b>Positive control</b> with 50 µl	Sacrifice and harvesting of tissue	
2	30					Sacrifice and harvesting of tissue
3	10			Intranasal inoculation <b>test substance 1</b> with 50 µl	Sacrifice and harvesting of tissue	
4	30					Sacrifice and harvesting of tissue
5	10			Intranasal inoculation <b>test substance 2</b> with 50 µl	Sacrifice and harvesting of tissue	
6	30					Sacrifice and harvesting of tissue
HOUSING		NORMAL	DM-II			

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

Voor het onderzoek wordt er gewerkt volgens de standaard EMEA richtlijnen (EMEA/CPMP/BWP/2289/01). Hierin wordt een aantal van 40 dieren per preparaat aangegeven (in eerste instantie 10 dieren per groep en bij afwezigheid van neurologische verschijnselen of replicatie in de hersenen nog 30 additionele dieren).

## B. De dieren

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

**Diersoort:** muizen (Swiss), vrouwelijk van 4-6 weken oud

In tegenstelling tot andere diersoorten (zoals fretten of NHP), is er een influenza virus beschikbaar dat geadapteerd is aan replicatie in de hersenen van muizen. De beschikbaarheid van een dergelijk virus biedt de mogelijkheid om gebruik te maken van deze positieve controle binnen de experimentele set-up. Daarnaast heeft reeds gepubliceerd onderzoek heeft aangetoond dat replicatie in de hersenen in deze muizenstam van dit geslacht en leeftijd aangetoond kan worden (Voeten et al). Alhoewel het geslacht niet gedefinieerd is in de EMEA richtlijnen, is voor deze dierproeven toch gekozen om voor vrouwelijke dieren te gaan. Dit is gebaseerd op de enige publicatie voor het testen van neurovirulentie van MDVs van Voeten et al. In deze publicatie zijn de experimenten zoals hier ook beschreven succesvol afgerond in vrouwelijke dieren. Indien informatie beschikbaar is die anderszijds aantoonde (vanuit regelgevende instanties of de leverancier), zal overwogen worden om met ofwel mannelijke ofwel gemengde geslachten te gaan werken. Indien dit laatste het geval is, zal ook het voorwerk (zoals beschreven in dierproef 1) in hetzelfde geslacht

uitgevoerd worden.

**Herkomst:** geregistreerde proefdierfokker

**Geschatte aantal:** 1200 dieren in 5 jaar

Er wordt verwacht om een dergelijke studie 2 keer per jaar uit te voeren voor twee test preparaten t.o.v. 1 positieve control, dus een totaal aantal van 2 maal x 5 jaar x 40 muizen x 3 groepen = 1200 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.

**Vervanging:** deze experimenten zijn opgezet om te bepalen of de test preparaten na intranasale toediening kunnen repliceren in de hersenen van de muis en klinische verschijnselen induceren. Dit is in vitro niet na te bootsen.

**Vermindering:** De aantallen zijn opgelegd door de regelgevende instanties. Daarnaast is er een GO/NO GO moment ingebouwd door eerst met een beperkt aantal dieren de experimenten aan te vangen en bij afwezigheid van neurologische verschijnselen en/of replicatie in de hersenen het vervolg in te zetten met een groter aantal dieren.

**Verfijning:** Meest invasieve behandelingen zullen uitgevoerd worden onder sedatie en dieren worden dagelijks geobserveerd.

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.

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt worden door het feit dat dieren gehuisvest zullen worden in HEPA gefilterde IVC bakken en handelingen zullen uitgevoerd worden in een veiligheidskabinet. Afval (bedding, kadavers en andere materialen gebruikt in de studie) zullen worden aangeboden voor destructie en/of worden gesteriliseerd. De gehele studie wordt uitgevoerd onder BSL II ingeperkte condities.

## 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.

n.v.t.

Alhoewel het hier experimenten betreffen die opgelegd zijn door regelgevende instanties (en dus een wettelijke vereiste zijn), zullen de test preparaten welke uitgetest zullen worden elke keer weer verschillend zijn van origine.

## 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?

(de inschatting is dat op basis van ervaring in eerdere dierproeven met de hier uit te testen virus stam, test preparaten en dosis/doses er geen pijn verwacht wordt in de dieren als gevolg van de infectie en vervolgens de replicatie in de luchtwegen/hersenen) Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Andere verschijnselen die de dieren kunnen vertonen, maar die niet gepaard gaan met pijn zijn:

- zijn algemene verschijnselen: opgezette vacht, gebogen postuur en verminderd actief bij stimulatie
- respiratoire verschijnselen: een verhoogde ademhalingsfrequentie (deze zal bij verergering overgaan in stokkende/schokkende ademhaling)
- neurologische verschijnselen: verstoorde locomotie zoals een instabiele gang (deze zal bij verergering overgaan in verlamming (parese en paralyse)).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Verschijnselen worden veroorzaakt door infectie met het influenza virus en vervolgens replicatie in de luchtwegen (respiratoire verschijnselen) of de hersenen (neurologische verschijnselen).

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

De inschatting is dat de dieren binnen de studie geen pijn zullen ondervinden (zie ook H). Daarnaast is het zo dat analgetica in het algemeen naast pijnstillende ook een ontstekingsremmende werking hebben en kunnen dus interfereren in de studie. Daarom is per definitie het gebruik van analgetica niet mogelijk in

deze experimenten tijdens de infectie fase. Indien de conditie van een dier dusdanig is dat het niet meer zelfstandig kan eten, zal er naast voer en water via de normale weg ook (bevochtigd) voer aangeboden worden op de bodem van de bak op een geschikte ondergrond (bv. petrischaal).

#### 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.

De dieren zullen dagelijks geobserveerd worden en klinische scores (zoals beschreven in de publicatie van Voeten et al.) worden genoteerd. Bij licht (MDVs) of matig (positieve controle) ongerief (zie hieronder de inschaling van de ongerief klassen) zal het betreffende dier uit de studie worden genomen. Deze klinische ongerief classificaties zijn:

Licht: 2 algemene symptomen\*

Matig: 3 algemene symptomen of neurologische verschijnselen\*

Ernstig: gewichtsverlies van >15%

\* algemene symptomen: opgezette vacht, gebogen postuur en verminderd actief

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

Op basis van gepubliceerde data is de verwachting dat 50% van de dieren licht en 50% van de dieren matig ongerief zal ondervinden door infectie met de positieve controle. Ernstig ongerief door het vertonen van gewichtsverlies van >15% wordt niet verwacht vanwege de korte tijdsduur van het experiment (5 dagen) en dit is tevens gebaseerd op eigen ervaringen met influenza virus in muizen.

Voor de dieren die geïnfecteerd worden met de test preparaten: voor deze preparaten is de verwachting dat ze niet kunnen repliceren in de hersenen/respiratoir weefsel en dus ook geen klinische verschijnselen vertonen (zoals ook beschreven door Voeten et al), dus de kans dat de dieren licht ongerief hebben is <5%.

#### K. Classificatie van ongerief

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

Het cumulatieve ongerief voor de positieve controle groep wordt ingeschaald op "matig" en van de overige test groepen op "licht".

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Om te zien of het virus neurovirulent is zullen de hersenen moeten worden verwijderd en zullen de virus titers worden bepaald. Daarnaast fungeren de virale titers na infectie met de positieve controle in het respiratoir weefsel als gate-keeper voor infectie. Dergelijke bemonsteringen zijn niet mogelijk uit een intact dier.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef   |
|------------|--|
| 3          | Veiligheid van influenza vaccin: Bevestiging van verzwakte fenotype in de longen van fretten |
- 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.

Naast het bepalen van de neurovirulentie van de master donor viruses (MDVs) zoals omschreven in volgnummers 1 en 2, is een tweede vereiste om te bepalen of de MDVs daadwerkelijk levend verzwakt zijn. Deze vereiste is voorgeschreven door de WHO en weergegeven in "WHO Expert Committee on Biological Standardization". Aangezien de MDVs als basis zullen dienen voor de productie van levend verzwakte influenza virus vaccins (LAIV: life attenuated influenza vaccines), dient het verzwakte vermogen aangetoond te worden in het fretten model. Hiertoe zullen fretten intranasaal geïnfecteerd worden met de MDVs en als controle zullen corresponderende wild-type virussen meegenomen worden. In deze experimenten zullen fretten gebruikt worden vanwege de gevoeligheid van deze diersoort voor niet geadapteerde virussen (i.t.t. de muis). Deze diersoort is derhalve een gevoelig model voor het bepalen van de afwezigheid van replicatie in de longen. De primaire uitleesparameter in deze experimenten zal derhalve ook zijn de afwezigheid van virale replicatie in de longen van fretten na toediening van de MDVs in tegenstelling tot de meegenomen positieve controle waarbij de testen om dit aan te tonen een kwalitatief karakter hebben. Positieve controle in deze experimenten zullen de wild-type virussen zijn, die wel degelijk kunnen repliceren in de luchtwegen van fretten.

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 opzet van dit soort experimenten inclusief de groepsgrootten is bepaald in de richtlijnen welke omschreven zijn in "WHO Expert Committee on Biological Standardization" en verder in <http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/influenza/Annex%205%20human%20pandemic%20influenza.pdf>.

Na binnenkomst (minimaal 3 weken voor start van het experiment), vervolgens wekelijks en na infectie dagelijks, zullen de dieren gewogen worden om de algemene gezondheidsstatus te volgen. Een acclimatisatieperiode van minimaal 7 dagen zal worden aangehouden. Minimaal 14 dagen voor de start van het experiment zal een zgn. nul-bloedmonster voor referentie in analyses afgenomen worden onder sedatie via de vena jugularis waarna een temperatuurlogger ingebracht zal worden. Dit zal gebeuren door middel van een operatie waarbij de buikwand geopend zal worden en de temperatuurlogger via de linea alba in de peritoneale holte geplaatst zal worden waarna de wond gehecht wordt. Deze temperatuurlogger meet de lichaamstemperatuur van het dier gedurende de looptijd van de studie (klinische parameter). Peri- en postoperatief zullen de dieren topicale pijnbestrijding krijgen om het genezingsproces te bevorderen en na afloop van de operatie zal de werking van de anesthesie geantagoneerd worden.

Op dag -1 zullen alle dieren bemonsterd (neus en keel) worden en op dag 0 via de intranasale route geïnoculeerd worden met een volume van 300ul van de verschillende preparaten. Het nul-monster wordt een dag voor de daadwerkelijke inoculatie uitgevoerd om geen interferentie te hebben met de inoculatie zelf. Na infectie zal de anesthesie geantagoneerd worden en zullen de dieren dagelijks of om de dag bemonsterd worden uit de bovenste luchtwegen (keel en neus) en op gezette tijdstippen (dag 3 en dag 14 na infectie) zal een aantal dieren geëuthanaseerd worden voor het verzamelen van relevant weefsel. Daarnaast zullen de dieren dagelijks tot het einde van de proef geobserveerd worden om te bepalen of er klinische verschijnselen te zien zijn.

Ter informatie staat hieronder een voorbeeld van de setup voor een dergelijke studie waarin 2 test preparaten uitgetest zullen worden:

Group		No/Group	d -14	Infection								
Group		No/Group	d -14	d -1	d0	d1	d3	d5	d7	d9	d14	
1	3	TS	∅	S	S	S	Sacrifice and harvest organs**	X	X	X	X	
2	3						Intranasal inoculation <b>Wild type A</b>	X	S	S	S	S; Sacrifice
3	3						Intranasal inoculation <b>Wild type B</b>	Sacrifice and harvest organs**	X	X	X	X
4	3							X	S	S	S	S; Sacrifice
5	3						Intranasal inoculation <b>Type MDV A</b>	Sacrifice and harvest organs**	X	X	X	X
6	3							X	S	S	S	S; Sacrifice
7	3						Intranasal inoculation <b>Type MDV B</b>	Sacrifice and harvest organs**	X	X	X	X
8	3							X	S	S	S	S; Sacrifice
HOUSING		NORMAL	DM-II									

Abbreviations: MDV = master donor virus; TS = temperature sensor; S = nose- and throat swabs

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

Voor het onderzoek wordt er gewerkt volgens de standaard EMEA richtlijnen (<http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/influenza/Annex%205%20human%20pandemic%20influenza.pdf>). Hierin is het aantal dieren per preparaat en per tijdstip vastgesteld (3 per preparaat per tijdstip).

## B. De dieren

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

**Diersoort:** mannelijke of vrouwelijke fretten (4-8 maanden oud)

Fretten zijn gevoelig voor infectie met wild-type klinische relevante influenza virussen en derhalve worden fretten bijvoorbeeld ook regelmatig gebruikt voor het genereren van anti-sera voor het typeren van influenza virussen. Derhalve zijn fretten ook een goed model voor het bepalen van het verzwakte fenotype van de betreffende vaccins vanwege de hoge gevoeligheid. Daarnaast zijn de klinische verschijnselen geobserveerd in fretten overeenkomstig met de klinische verschijnselen in mensen. Deze experimenten kunnen uitgevoerd worden in zowel mannelijke of vrouwelijke fretten, de keuze zal bepaald worden door de beschikbaarheid van een reeds gevalideerd model dat zal dienen als positieve controle en tevens zal ook de beschikbaarheid van de verschillende geslachten meegenomen worden in de keuze.

**Herkomst:** geregistreerde fokker in de EU

Er is een jarenlange relatie met de betreffende fokker en in overleg met de aanvrager is een huisvestingsregime opgesteld dat de influenza-specifieke seronegativiteit van de dieren waarborgt. Derhalve kunnen de resultaten verkregen in de afzonderlijke dierstudies ook daadwerkelijk gebruikt worden in het registratie proces van de uit te testen preparaten.

**Geschat aantal:** 240 dieren

Er wordt verwacht om een dergelijke studie 2 keer per jaar uit te voeren voor twee test preparaten t.o.v. 2 positieve controles (in lijn met volgnummer 2), dus een totaal aantal van 2 maal x 5 jaar x 6 fretten x 4 groepen = 240 fretten.

### 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.

**Vervanging:** deze dierproef is opgezet om de veiligheid van vaccins te bestuderen tegen infectie met influenza virus. Dergelijke studies zijn niet mogelijk zonder in vivo modellen. Naast het uittesten van de mogelijk neurovirulente eigenschappen in de muis, stellen de regelgevende instanties ook dat het verzwakte fenotype bestudeerd dient te worden in het fretten model.

**Vermindering:** De voorgestelde aantallen zijn opgelegd door de regelgevende instanties.

**Verfijning:** Invasieve handelingen zullen uitgevoerd worden onder sedatie. Er zullen zoveel mogelijk handelingen tijdens hetzelfde sedatiemoment worden uitgevoerd zoals vaccinatie, bloedafname en bemonstering uit de luchtwegen. Wanneer de dieren gesedeerd zijn worden ze ook gewogen. Maximaal zullen er per dierstudie 16 sedatie momenten zijn afhankelijk van de frequentie van het afnemen van monsters uit de bovenste luchtwegen. Daarnaast zullen de dieren dagelijks geobserveerd en indien dit noodzakelijk bevonden wordt vanuit een welzijnsstandpunt gewogen 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.

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt worden door het feit dat dieren gehuisvest zullen worden onder minimaal een DM2 regime, handelingen uitgevoerd zullen worden in een veiligheidskabinet onder ML2 regime en afval (bedding, kadavers en andere materialen

gebruikt in de studie) aangeboden zal worden voor destructie.

## 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.

n.v.t. Alhoewel het hier experimenten betreffen die opgelegd zijn door regelgevende instanties (en dus een wettelijke vereiste zijn), zullen de test preparaten welke uitgetest zullen worden elke keer weer verschillend zijn van origine.

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

Na de operatieve plaatsing van de temperatuur loggers zullen de dieren peri- en post operatief pijnbestrijding krijgen (meloxicam). Als gevolg van de infectie en vervolgens replicatie van het virus in de luchtwegen, is de inschatting dat de dieren geen pijn zullen ondervinden.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?



Andere verschijnselen die de dieren kunnen vertonen, maar die niet gepaard gaan met pijn zijn:

- zijn algemene verschijnselen: gewichtsverlies en verminderd actief bij stimulatie
- respiratoire verschijnselen: een verhoogde ademhalingsfrequentie (deze zal bij verergering overgaan in stokkende/schokkende ademhaling)
- neurologische verschijnselen: verstoorde locomotie zoals een instabiele gang en/of ongecontroleerde bewegingen (deze zal bij verergering overgaan in verlamming (parese en paralyse)).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De klachten worden veroorzaakt door infectie met het influenza virus en vervolgens replicatie in de luchtwegen (respiratoire verschijnselen) of de hersenen (neurologische verschijnselen).

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

Behalve na implantatie van de temperatuur loggers, is de inschatting is dat de dieren binnen de studie geen pijn zullen ondervinden als gevolg van de infectie (zie ook H). Daarnaast is het zo dat de meest gangbare analgetica in het algemeen naast pijnstillende ook een ontstekingsremmende werking hebben en kunnen dus interfereren in de studie. Daarom is per definitie het gebruik van dergelijke analgetica niet mogelijk in deze experimenten vanwege verstoring van de primaire uitlees parameter.

## 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.

Tijdens de challenge fase kunnen infectie gerelateerde verschijnselen optreden welke leiden tot de volgende humane eindpunten. Bij het vertonen 1 van de volgende humane eindpunten (matig ongerief) zal het betreffende dier geëuthanaseerd worden:

1. Gewichtsverlies: na infectie met de positieve controle virussen of de betreffende MDVs worden de dieren dagelijks gewogen. Het humane eindpunt is gedefinieerd als het betreffende dier 10% of meer gewicht verliest (geclassificeerd als matig ongerief) t.o.v. het startgewicht op de dag van challenge (hoewel de middelen daartoe erg beperkt zijn, kan ook bekeken worden tijdens de challenge fase of een betreffend dier solitair gehuisvest kan worden).
2. Respiratie: bij verergering van de ziekte zal de ademhaling veranderen van normale naar een verhoogde ademhalingsfrequentie (licht ongerief). Bij verergering van de symptomen naar stokkende / schokkende ademhaling zal het dier geëuthanaseerd worden (matig ongerief).
3. Diarree: indien in de huisvesting te zien is dat een of meerdere dieren diarree (geclassificeerd als matig) hebben, zullen alle dieren afzonderlijk beoordeeld worden om te bepalen of er aanwijzingen zijn (vuile vacht rond de anus) welke dieren daadwerkelijk diarree vertonen.

Bij de volgende verschijnselen zullen de dieren direct geëuthanaseerd worden (beide geclassificeerd als ernstig ongerief):

4. Neurologisch: in enkele gevallen kan het virus vanuit de neus van het dier doorslaan naar de hersenen en zo een ontsteking van de hersenen induceren. De daarbij behorende verschijnselen zijn onstabiele gang en ongecontroleerde bewegingen (zoals beschreven in Bodewes et al 2015 AJP).
5. Lethargie: indien een dier lethargisch is (m.a.w. als het niet meer reageert op externe prikkels).

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

De positieve controle dieren (geïnfecteerd met wild-type influenza virus) hebben 100% kans om bovenstaande verschijnselen omschreven bij 1 t/m 3 te tonen, verschijnselen zoals beschreven bij 4 en 5 worden niet verwacht en zijn ingeschaald op <5%. Voor de dieren die behandeld worden met de verschillende MDVs is de kans zeer klein dat ze klinische symptomen zoals beschreven bij 1 t/m 5 ontwikkelen (<5%).

## 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 dieren zullen een matig ongerief ervaren van de inoculatie van de virussen, ontwikkeling van klinische symptomen en de bijkomende sedatie momenten.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

De dataloggers worden verwijderd en er zullen verschillende weefsels worden verzameld om de virale load hier in te bepalen. Dit is niet mogelijk bij in leven laten van de dieren.

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



- Nadere toelichting en helderder beschrijving van de doelstellingen en de onderlinge afhankelijkheid van deze doelstellingen, zodat hieruit duidelijk valt op te maken dat het project als een toetsbare eenheid dient te worden opgevat, danwel verzoek om de aanvraag op te splitsen in meerdere separate aanvragen.
- Nader toelichting van het belang van het project, specifiek in het licht van de doelstellingen.
- Nadere toelichting en onderbouwing van het gebruikte diermodel.
- Onderbouwing van het gebruik van uitsluitend vrouwelijke muizen.
- Onderbouwing van de noodzaak van het elk jaar uitvoeren van deze test.
- Nadere toelichting en onderbouwing van de keuze van de tijdpunten waarop de dieren worden geëthanaseerd voor het bepalen van de virale load in respiratoir- en hersenweefsel.
- Nadere toelichting en onderbouwing en zo mogelijk verdere aanscherping van de humane eindpunten.
- Toelichting m.b.t. de berekening van de aantallen dieren.
- Redactionele aspecten: Nader verduidelijken danwel toespitsen van diverse tekstpassages en een logische en consequente opname van tekstpassages bij de desbetreffende (sub)hoofdstukken in elk formulier. Zorgvuldig en consequent afstemmen van de tekst van de het projectvoorstel en de verschillende bijlagen onderling.

De correspondentie d.d. 18-01-2016 had betrekking op:

- Redactionele aspecten: Zorgvuldig en consequent afstemmen van de tekst van het projectvoorstel en de verschillende bijlagen onderling, m.n. met betrekking tot de inschatting van de welzijnsaantasting en de keuze voor het geslacht van de dieren.
- Datum antwoord: 04-01-2016 en 11-02-2016
  - Strekking van de antwoorden: De vragen en opmerkingen zijn voldoende beantwoord. De aanvraag is na aanpassing volledig en duidelijk.
  - De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.; de DEC zelf beschikt over de relevante expertise.

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

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

## C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

X uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord

X wettelijk vereist

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

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling.

Jaarlijks circulerende seizoensgriepvirussen treffen jaarlijks tussen de 5 - 10% van de volwassenen en 20 - 30% van alle kinderen. Ontwikkeling van griep kan met name in de zogenaamde risicogroepen (baby's, jonge kinderen, bejaarden en chronisch zieken) leiden tot hospitalisatie en sterfte. Naar schatting leiden de jaarlijkse epidemieën wereldwijd tot 3 - 5 miljoen ernstig zieken en 250.000 - 500.000 sterfgevallen. Daarnaast kan ernstige ziekte optreden als er sprake is van infectie met zogenaamde 'pandemische' griepvirussen, welke relatief nieuw zijn en waartegen mensen nog geen bescherming hebben opgebouwd door vaccinatie of eerdere infectie. Infecties als gevolg van deze beide typen griepvirussen hebben daarom wereldwijd grote gevolgen voor de volksgezondheid, en en zijn tevens verantwoordelijk voor aanzienlijke economische en maatschappelijke gevolgen.

Seizoensvaccins tegen griep moeten elk jaar worden afgestemd op de dan circulerende griepvirussen. Vaccinproducenten werken daarom constant aan de ontwikkeling van vaccins tegen beide typen griepvirussen. Een belangrijke ontwikkeling op dit gebied zijn de zogenaamde 'levend verzwakte' griepvaccins. Deze vaccins kunnen door hun specifieke eigenschappen bescherming bieden tegen een breed scala aan griepvirussen. Door de regelgevende instanties zijn echter voorwaarden opgelegd om de veiligheid van dit soort vaccins te waarborgen.

Doel van dit project is het (in opdracht van derden) uittesten van de veiligheid van levend verzwakte griepvaccins. De veiligheid wordt getest door aan te tonen dat het vaccinavirus na toediening niet repliceert in de ontvanger van het vaccin. De resultaten uit deze studie leveren een bijdrage aan de kennis over de veiligheid van nieuwe generatie verzwakte griepvaccins. Kortom, een belangrijke stap in het ontwikkeltraject van vaccins is het testen

op werkzaamheid en veiligheid. Het is van belang dat fabrikanten deze fase in de ontwikkeling van een vaccin kunnen laten uitvoeren door hierin gespecialiseerde bedrijven, aangezien dit ten goede komt aan de kwaliteit van de evaluatie van de vaccins. De commissie schat het belang van de studie derhalve in als een substantieel belang.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De instelling heeft een uitgebreide ervaring met het uitvoeren van dit soort testen (in opdracht van derden) en beschikt over gespecialiseerde kennis m.b.t. de gebruikte diermodellen.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd. Voor deze studie worden muizen en fretten gebruikt. Dit zijn de meest geëigende (en tevens kleinst mogelijke) diermodellen om respectievelijk replicatie van het vaccinvirus in de hersenen danwel de longen te bepalen.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Als gevolg van de toediening van de verschillende preparaten kunnen de dieren last krijgen van luchtwegverschijnselen en neurologische verschijnselen. Voor de muizen betekent dit dat er voor 60% van de dieren een lichte en 40% van de dieren sprake zal zijn van een matige aantasting van het welzijn. Van de fretten zal 100% van de dieren een matige aantasting van het welzijn ondergaan.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De voorgestelde studies zijn alleen mogelijk in diermodellen met een intact afweersysteem. Waar mogelijk zal in het voortraject van de studie zo veel mogelijk proefdiervrij onderzoek worden uitgevoerd (bijv. door middel van celkweek technieken).
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De groepsgrootte is grotendeels bepaald door regelgevende instanties. Indien mogelijk zullen de resultaten van eerdere studies gebruikt worden om de groepsgrootte te bevestigen en zo nodig aan te passen. Bovendien worden de experimenten gefaseerd opgezet om een onnodig gebruik van dieren te voorkomen.

De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Invasieve handelingen worden uitgevoerd onder sedatie en de dieren worden intensief gecontroleerd. Er zijn humane eindpunten opgesteld om te voorkomen dat de dieren met een hogere mate van welzijnsaantasting worden geconfronteerd dan ingeschat. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

## **D. Ethische afweging**

Op basis van de overwegingen onder bovenstaand punt C (1 t/m 9) komt de commissie tot de volgende ethische afweging.

Infecties als gevolg van jaarlijks circulerende seizoensgriepvirussen en zgn. pandemische influenzavirussen hebben wereldwijd grote gevolgen voor de volksgezondheid, en zijn bovendien verantwoordelijk voor aanzienlijke economische en maatschappelijke gevolgen. Vaccinproducenten werken constant aan de ontwikkeling van vaccins tegen beide typen griepvirussen. Regelgevende instanties leggen daarbij voorwaarden op om de veiligheid van dit soort vaccins te waarborgen. Doel van dit project is het (in opdracht van derden) uittesten van de veiligheid van levend verzwakte influenza vaccins. Het is van belang dat fabrikanten deze fase in de ontwikkeling van een vaccin kunnen laten uitvoeren door hierin gespecialiseerde bedrijven, aangezien dit ten goede komt aan de kwaliteit van de evaluatie van de vaccins.

De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling. Naar het oordeel van de DEC dient het project dan ook een substantieel belang. Tegenover dit substantiële belang staat het feit dat alle dieren in deze experimenten een aantasting van het welzijn zullen ervaren. Voor de muizen betekent dit dat 60% van de dieren een lichte en 40% van de dieren een matige aantasting van het welzijn. Voor de fretten betekent dit voor 100% van de dieren een matige aantasting van het welzijn. De commissie is er van

overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling is gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en de daarbij optredende welzijnsaantasting is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hierboven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren rechtvaardigt.

Op termijn kan het project voordelen opleveren voor de mens.

## **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

BioXpert BV

██████████  
Nistelrooise Baan 3  
5347 RE SCHAIJK  
██████████

**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  
AVD905002016412

**Bijlagen**

2

Datum 2 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ██████████

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD905002016412. 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](http://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: 90500  
Naam instelling of organisatie: BioXpert BV  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 54838134  
Straat en huisnummer: Nistelrooise Baan 3  
Postcode en plaats: 5347 RE SCHAIJK  
IBAN: NL72RABO0183605888

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]

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 maart 2016  
Geplande einddatum: 28 februari 2021  
Titel project: Uittesten van veiligheid van levend verzwakte influenza vaccins in muizen en fretten  
Titel niet-technische samenvatting: Veiligheid van levend verzwakte griepvaccins in muizen en fretten.  
Naam DEC: [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.441,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:             Projectvoorstel  
    Beschrijving Dierproeven  
    Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:                 DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:                                  
Functie:                               
Plaats:                              Schaijk  
Datum:                               25 februari 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

Nistelrooise Baan 3

5347 RE SCHAIJK



**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  
AVD905002016412

**Bijlagen**

2

Datum 2 maart 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 2 maart 2016

Vervaldatum: 1 april 2016

Factuurnummer: 16700412

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD905002016412	€ 1.441,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert B.V.

Nistelrooise Baan 3

5374RE Schaijk



**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  
AVD905002016412

Datum 22 maart 2016

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

**Bijlagen**

1

Op 2 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Uittesten van veiligheid van levend verzwakte influenza vaccins in muizen en fretten.' met aanvraagnummer AVD905002016412. 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**

U beschrijft in de tweede bijlage beschrijving dierproeven (Veiligheid van influenza vaccin: Neurovirulentie in muizen) het gebruik van alleen vrouwelijke muizen. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Aangezien de richtlijn het gebruik van beide geslachten niet beperkt en het feit dat meer wetenschappelijke artikelen op dit gebied ontbreken, zou het wetenschappelijk nuttig zijn om de neurovirulentie in beide geslachten te testen. Is er een wetenschappelijke reden om te verwachten dat de resultaten gevonden in vrouwelijke muizen uit eerder onderzoek anders zouden zijn in mannelijke muizen?

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.

**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. Om uw aanvraag in de eerstvolgende CCD

vergadering te kunnen bespreken verzoeken we u vriendelijk om uiterlijk donderdag, 24 maart 2016, uw antwoord aan ons te sturen.

**Datum**

22 maart 2016

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD905002016412

**Wanneer een beslissing**

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://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](http://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

**BioXpert B.V.**

Nistelrooise Baan 3  
5374 RE Schaijk  
The Netherlands  
T: +31 (0) 486-463303  
F: +31 (0) 486-463498

info@bioxpert.nl  
www.bioxpert.nl

To: CCD  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Date: 25 maart 2016

RE: Aanvullende vraag voor projectvergunning dierproeven AVD905002016412, afgegeven d.d. 22 maart 2016.

Cc: [REDACTED]

Geachte leden van de Centrale Commissie Dierproeven,

Op 22 maart 2016 ontvingen we uw aanvullende vraag op projectaanvraag AVD905002016412, getiteld 'Uittesten van veiligheid van levend verzwakte influenza vaccins in muizen en fretten'. In uw brief stelt u de volgende vraag:

*"U beschrijft in de tweede bijlage beschrijving dierproeven (Veiligheid van influenza vaccin: Neurovirulentie in muizen) het gebruik van alleen vrouwelijke muizen. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Aangezien de richtlijn het gebruik van beide geslachten niet beperkt en het feit dat meer wetenschappelijke artikelen op dit gebied ontbreken, zou het wetenschappelijk nuttig zijn om de neurovirulentie in beide geslachten te testen. Is er een wetenschappelijke reden om te verwachten dat de resultaten gevonden in vrouwelijke muizen uit eerder onderzoek anders zouden zijn in mannelijke muizen? Wij vragen u deze informatie te verduidelijken."*

Wij zijn ons ervan bewust dat de CCD waarde hecht aan het terugdringen van het doden van (surplus) dieren in voorraad, wij hebben hetzelfde streven en deze visie is meegenomen in de project aanvragen die tot nu toe ingediend zijn. Bij iedere aanvraag wordt de afweging gemaakt voor het gebruik van een bepaald geslacht of indien van toepassing beide geslachten. Factoren die hierin meegenomen worden zijn:

- Beschikbaarheid van dieren van een bepaald geslacht en een eventueel overschot van het andere geslacht bij de leverancier
- Reeds bekende resultaten al dan niet gepubliceerd
- Richtlijnen die opgelegd worden door regelgevende instanties (zoals de FDA of de EMA)

Binnen deze project aanvraag in bijlage 1 en 2 is bewust gekozen voor het vrouwelijke geslacht. Deze keuze is niet expliciet opgelegd door de regelgevende instanties (zoals uzelf ook al noemt in uw opmerking), maar vanwege de (helaas beperkte) publiekelijke informatie van het model. Deze regelgevende instanties gebruiken de aangehaalde publicatie van Voeten *et al* als richtlijn voor de uit te voeren experimenten en in deze publicatie is exclusief gebruik gemaakt van vrouwelijke dieren.

Daarnaast is de verwachting dat de spreiding van de resultaten bij gebruik van beide geslachten groter zal zijn. Dat zal betekenen dat in de dierstudies zoals omschreven in bijlage 1 en 2 mogelijk meer dieren gebruikt zullen worden en vanuit het oogpunt van vermindering van proefdiergebruik is dit niet wenselijk.

Wij hopen dat de hierboven genoemde motivatie voor u voldoende is om toestemming te verlenen tot het gebruik van vrouwelijke dieren binnen AVD905002016412 voor wat betreft het gebruik van muizen binnen dit project (bijlage 1 en 2).

Met vriendelijke groet

A large black rectangular redaction box covers the signature and name of the sender. The redaction consists of three overlapping rectangular blocks of varying sizes and positions, completely obscuring the text underneath.

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** dinsdag 5 april 2016 15:24  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** AVD905002016412: voorgenomen besluit

Geachte [REDACTED]

Wij hebben een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven van u in behandeling. Het gaat om het project 'Uittesten van veiligheid van levend verzwakte influenza vaccins in muizen en fretten' met aanvraagnummer AVD905002016412.

De CCD heeft uw aanvraag besproken en is voornemens deze goed te keuren. De CCD wil echter een aantal voorwaarden toevoegen aan de vergunning waaronder één die mogelijk consequenties zou kunnen hebben voor de uitvoering van uw project. Deze voorwaarde en de argumentatie hiervoor vindt u hieronder.

Voorgenomen voorwaarde:

***De vergunning wordt afgegeven onder de voorwaarde dat de neurovirulentie proeven (3.4.4.1 en 3.4.4.2) in beide geslachten uitgevoerd worden. Indien gedurende het project blijkt dat er overige geslachts-specifieke effecten zijn, kunt u deze informatie als wijziging rapporteren aan de CCD. Deze informatie kan voor de CCD aanleiding zijn om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten te wijzigen of in te trekken. Indien voorafgaand aan de proeven al informatie in de literatuur beschikbaar is waaruit blijkt dat een model of proces geslachtsafhankelijk zou zijn, is het ook mogelijk om deze informatie te gebruiken om wetenschappelijk te onderbouwen dat het gebruik van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren niet zou leiden tot het behalen van de doelstelling en dit aan ons te rapporteren.***

Onderbouwing:

*Deze voorwaarde is gesteld omdat in uw aanvraag en in uw reactie op onze vraag geeft u aan alleen vrouwelijke muizen in uw onderzoek te willen gebruiken. U onderbouwt uw keuze door naar de voor uw onderzoek relevante regelgevende instanties (FDA en EMEA) te verwijzen. U geeft zelf aan dat deze instanties niet duidelijk het gebruik van slechts één geslacht vereisen, maar dat ze alleen het enige gepubliceerd relevante artikel benoemen. Naar onze mening, sluit dit niet uit dat ook mannelijke dieren gebruikt kunnen worden en dat de resultaten van het onderzoek met mannelijke dieren niet wetenschappelijk en mogelijk ook wettelijk nuttig zouden zijn.*

Indien u een bewijs van de relevante instanties aan ons kunt laten zien waarin ze verklaren dat ze het onderzoek met beide geslachten (dus ook met mannelijke dieren) niet accepteren, ontvangen we dat graag. Indien u deze verklaring van de regelgevende instantie heeft, dan kan de bovengenoemde voorwaarde komen te vervallen.

Aangezien bovengenoemde voorwaarde mogelijk de uitvoering van uw project kan beïnvloeden, wil de CCD u nog in de gelegenheid stellen te reageren op deze voorwaarde alvorens zij een definitief besluit neemt. Daarnaast willen wij de DEC vragen de CCD aanvullend te adviseren over deze voorwaarde. Indien uw reactie of het aanvullend advies van de DEC daar aanleiding toe geeft, kan de CCD haar voorgenomen besluit nog herzien.

Om u hiervoor de gelegenheid te kunnen geven, en uw reactie vervolgens tijdens de CCD vergadering te kunnen bespreken, dienen wij de behandeltermijn op te schorten. Hoewel de CCD uw aanvraag binnen de wettelijke termijn van 40 werkdagen heeft beoordeeld, zullen we, door u in de gelegenheid te stellen te reageren op het voorgenomen besluit, de termijn van 40 werkdagen mogelijk overschrijden. Wij kunnen u daarom alleen in de gelegenheid stellen te reageren, indien u instemt met het opschorten van de behandeltermijn totdat de CCD uw aanvraag opnieuw kan bespreken en een definitief besluit kan nemen.

Indien u gebruik wilt maken van de mogelijkheid te reageren op de voorgenomen voorwaarde, verzoeken wij u in te stemmen met het opschorten van de behandeltermijn en ons hiervan uiterlijk **7 april 2016** op de hoogte te stellen.


Indien u gebruik maakt van bovenstaande mogelijkheid, wordt u verzocht uiterlijk **13 april 2016** inhoudelijk te reageren en eventueel aanvullende informatie aan te leveren. Wij zullen uw reactie vervolgens doorsturen naar de DEC die advies heeft uitgebracht over uw aanvraag en deze vragen de CCD naar aanleiding van uw reactie aanvullend te adviseren over bovengenoemde voorwaarde.

Mocht u geen gebruik willen maken van de mogelijkheid te reageren of instemmen met de voorgenomen voorwaarde, verzoeken wij u ons dat ook uiterlijk **7 april 2016** te laten weten. Het voorgenomen besluit zal dan

definitief gemaakt worden. Indien wij dan niets van u gehoord hebben, gaan wij er ook van uit dat u geen gebruik wilt maken van de mogelijkheid om aanvullende informatie te verstrekken.

Wij wachten uw reactie af.

Met vriendelijke groet,

  
*Uitvoeringsexpert*

**Centrale Commissie Dierproeven** [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

**T: 0900 2800028**

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

Geachte leden van de CCD,

Onderstaande e-mail (blauwe tekst) stuurde u op 5 april naar de aanvrager van AVD905002016412. Eerder, op 22 maart heeft u [REDACTED] op de hoogte gesteld van het feit dat u de aanvrager een vraag heeft voorgelegd over deze kwestie (gebruik van beide geslachten). Uit onderstaande e-mail leidt [REDACTED] af dat u graag advies wilt van de DEC over uw voornemen om als voorwaarde te stellen dat de neurovirulentieproeven in beide geslachten dienen te worden uitgevoerd. Hieronder volgt dit advies.

### Advies

De DEC wil allereerst opmerken dat zij de onderbouwing van de voorwaarde, zoals die hieronder in de mail is opgenomen, warrig en slecht geformuleerd vindt.

De DEC constateert dat de regelgevende instanties niet stellen dat de neurovirulentieproeven dienen te worden uitgevoerd met dieren van één geslacht. De DEC heeft geen data en onderzoeksresultaten gezien die aanleiding geven te denken dat door het gebruiken van beide geslachten veel meer dieren nodig zouden zijn of het behalen van de doelstellingen van de experimenten in gevaar zou komen. De DEC zou het overigens ethisch onaanvaardbaar vinden, en ook in strijd met de Wet op de dierproeven, als de experimenten met beide geslachten uitgevoerd zouden worden, terwijl al gebleken is dat dit een substantieel aantal extra dieren vergt. Het uitvoeren van de experimenten met dieren van slechts één geslacht is in dat geval een verplicht verminderingsalternatief. Er zijn immers geen wetenschappelijke of regulatoire redenen om beide geslachten te gebruiken. Dat klemt des te meer, omdat het om belastende experimenten gaat. [REDACTED] adviseert daarom dringend om in een zo vroeg mogelijk stadium te evalueren of het gebruik van beide geslachten niet zal leiden tot het gebruik van meer dieren of het mislukken van de experimenten.

In uw onderbouwing lijkt u verder te suggereren (de betreffende zin is grammaticaal helaas onjuist, waardoor dit niet helemaal duidelijk is) dat het wetenschappelijk gezien nuttig zou kunnen zijn om te onderzoeken of voor deze proeven ook mannelijke dieren (of beide geslachten) gebruikt kunnen worden. Mogelijk is dat zo, maar de argumentatie daarvoor ontbreekt.

Uw aanname is dat het gebruik van alleen vrouwelijke dieren tot een fokoverschot van mannelijke dieren leidt dat ongebruikt zal blijven, hetgeen u ongewenst acht. De DEC heeft geen gegevens gezien die uw aanname, dat het (vermeende) fokoverschot van de mannelijke dieren ongebruikt zal blijven, ondersteunen. De DEC meent dat er redenen zijn om aan te nemen dat die aanname niet juist is, maar het hier vermelden van die redenen zou te ver voeren, nu de aanvrager al heeft aangegeven in te stemmen met de voorwaarde.

De DEC constateert tenslotte dat de aanvrager u laat weten schoorvoetend in te stemmen met de voorwaarde, omdat hij zich geen verder tijdverlies kan permitteren. De DEC ziet op dit moment geen reden om anders te adviseren, maar benadrukt nogmaals dat zij het om hierboven reeds genoemde redenen van groot belang vindt om in een zo vroeg mogelijk stadium te evalueren of het gebruik van beide geslachten niet zal leiden tot het gebruik van meer dieren of het mislukken van de experimenten. Het belang van het voorkomen van een (vooralsnog vermeend) fokoverschot weegt niet op tegen het gebruik van een substantieel aantal extra dieren en/of onnodig ongerief voor dieren wanneer de proeven niet tot bruikbare resultaten blijken te leiden.

Met vriendelijke groet,  
namens de DEC van [REDACTED],

[REDACTED]  
[REDACTED]

---

**From:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Sent:** dinsdag 5 april 2016 15:24  
**To:** [REDACTED]  
**Cc:** [REDACTED]  
**Subject:** AVD905002016412: voorgenomen besluit

Geachte [REDACTED]

Wij hebben een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven van u in behandeling. Het gaat om het project 'Uittesten van veiligheid van levend verzwakte influenza vaccins in muizen en fretten' met aanvraagnummer AVD905002016412.

De CCD heeft uw aanvraag besproken en is voornemens deze goed te keuren. De CCD wil echter een

aantal voorwaarden toevoegen aan de vergunning waaronder één die mogelijk consequenties zou kunnen hebben voor de uitvoering van uw project. Deze voorwaarde en de argumentatie hiervoor vindt u hieronder.

Voorgenomen voorwaarde:

***De vergunning wordt afgegeven onder de voorwaarde dat de neurovirulentie proeven (3.4.4.1 en 3.4.4.2) in beide geslachten uitgevoerd worden. Indien gedurende het project blijkt dat er overige geslachts-specifieke effecten zijn, kunt u deze informatie als wijziging rapporteren aan de CCD. Deze informatie kan voor de CCD aanleiding zijn om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten te wijzigen of in te trekken. Indien voorafgaand aan de proeven al informatie in de literatuur beschikbaar is waaruit blijkt dat een model of proces geslachtsafhankelijk zou zijn, is het ook mogelijk om deze informatie te gebruiken om wetenschappelijk te onderbouwen dat het gebruik van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren niet zou leiden tot het behalen van de doelstelling en dit aan ons te rapporteren.***

Onderbouwing:

*Deze voorwaarde is gesteld omdat in uw aanvraag en in uw reactie op onze vraag geeft u aan alleen vrouwelijke muizen in uw onderzoek te willen gebruiken. U onderbouwt uw keuze door naar de voor uw onderzoek relevante regelgevende instanties (FDA en EMEA) te verwijzen. U geeft zelf aan dat deze instanties niet duidelijk het gebruik van slechts één geslacht vereisen, maar dat ze alleen het enige gepubliceerd relevante artikel benoemen. Naar onze mening, sluit dit niet uit dat ook mannelijke dieren gebruikt kunnen worden en dat de resultaten van het onderzoek met mannelijke dieren niet wetenschappelijk en mogelijk ook wettelijk nuttig zouden zijn.*

Indien u een bewijs van de relevante instanties aan ons kunt laten zien waarin ze verklaren dat ze het onderzoek met beide geslachten (dus ook met mannelijke dieren) niet accepteren, ontvangen we dat graag. Indien u deze verklaring van de regelgevende instantie heeft, dan kan de bovengenoemde voorwaarde komen te vervallen.

Aangezien bovengenoemde voorwaarde mogelijk de uitvoering van uw project kan beïnvloeden, wil de CCD u nog in de gelegenheid stellen te reageren op deze voorwaarde alvorens zij een definitief besluit neemt. Daarnaast willen wij de DEC vragen de CCD aanvullend te adviseren over deze voorwaarde. Indien uw reactie of het aanvullend advies van de DEC daar aanleiding toe geeft, kan de CCD haar voorgenomen besluit nog herzien.


Om u hiervoor de gelegenheid te kunnen geven, en uw reactie vervolgens tijdens de CCD vergadering te kunnen bespreken, dienen wij de behandeltermijn op te schorten. Hoewel de CCD uw aanvraag binnen de wettelijke termijn van 40 werkdagen heeft beoordeeld, zullen we, door u in de gelegenheid te stellen te reageren op het voorgenomen besluit, de termijn van 40 werkdagen mogelijk overschrijden. Wij kunnen u daarom alleen in de gelegenheid stellen te reageren, indien u instemt met het opschorten van de behandeltermijn totdat de CCD uw aanvraag opnieuw kan bespreken en een definitief besluit kan nemen.

---



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

Nistelrooise Baan 3  
5347 RE SCHAIJK  


**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  
AVD905002016412  
**Bijlagen**  
1

Datum 14 april 2016  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 2 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Uittesten van veiligheid van levend verzwakte influenza vaccins in muizen en fretten" met aanvraagnummer AVD905002016412. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 29 maart 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft gereageerd op het verzoek van de CCD om het gebruik van alleen vrouwelijke dieren wetenschappelijk te onderbouwen.

### **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. In uw aanvraag geeft u aan in dierproef 3.4.4.1 mannelijke en vrouwelijke muizen te kunnen gebruiken, maar in dierproef 3.4.4.2 alleen vrouwelijke dieren. Hiervoor is er door de CCD naar nadere onderbouwing gevraagd. In uw reactie van 29 maart 2016 op dit verzoek schrijft u dat 'binnen deze project aanvraag in bijlage 1 en 2 is bewust gekozen voor het vrouwelijke geslacht'. U geeft ook aan dat de regelgevende instanties niet expliciet naar studies met slechts een geslacht vragen, en dat er maar één wetenschappelijke publicatie met hetzelfde model bekend is, waarin vrouwelijke muizen zijn gebruikt. De CCD is van mening dat uw motivering van het gebruik van alleen vrouwelijke muizen onvoldoende wetenschappelijke basis heeft. In het kader van vermindering van de dieren in voorraad gedood stelt de CCD de specifieke voorwaarde over het gebruik van muizen van beide geslachten in de dierproeven 3.4.4.1. en 3.4.4.2. Bovendien kunnen de resultaten uit uw onderzoek met beide geslachten toegevoegde wetenschappelijke



waarde hebben.

Van 5 april 2016 tot en met 13 april 2016 hebben wij u in de gelegenheid gesteld te reageren op ons voorgenomen voorwaarde. U heeft tot op heden echter niet inhoudelijk gereageerd op het voorgenomen voorwaarde en geen aanvullende informatie verstrekt. [REDACTED] heeft op 11 april 2016 haar advies over deze voorwaarde naar de CCD gestuurd. Hierin laat de DEC de CCD weten dat u met deze voorwaarde instemt.

Omdat voorafgaand aan de start van dit project niet alle criteria waarop het wordt gekozen om wel dan niet verder te gaan met het experiment in detail bekend zijn, stelt de CCD vast dat u deze criteria en de keuze om wel of niet verder te gaan met uw onderzoek moet met de IvD worden afgestemd. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Uittesten van veiligheid van levend verzwakte influenza vaccins in muizen en fretten" starten. De vergunning wordt afgegeven van 14 april 2016 tot en met 28 februari 2021. De looptijd van de vergunning wijkt af omdat de startdatum in de aanvraag in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie [REDACTED] gevoegd. Dit advies is opgesteld op 14 februari 2016.

Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Op 11 april 2016 heeft de DEC haar advies aangevuld met haar mening over de specifieke voorwaarde verbonden aan uw vergunning over het gebruik van muizen van beide geslachten in de dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2. In dezelfde brief laat de DEC de CCD weten dat u met deze voorwaarde instemt. Het advies van de commissie, nemen wij gedeeltelijk over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering, met uitzondering van de afwijkingen zoals hierboven gemotiveerd. Het DEC-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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

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

## Projectvergunning

### gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: BioXpert BV  
Adres: Nistelrooise Baan 3  
Postcode en plaats: 5347 RE SCHAIJK  
Deelnemersnummer: 90500

deze projectvergunning voor het tijdvak 14 april 2016 tot en met 28 februari 2021, voor het project "Uittesten van veiligheid van levend verzwakte influenza vaccins in muizen en fretten" met aanvraagnummer AVD905002016412, gedeeltelijk volgens advies van Dierexperimentencommissie

Hierbij is afgeweken van het DEC-advies omdat er een specifieke voorwaarde is gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Voor de uitvoering van het project is Voorzitter IvD verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 2 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 2 maart 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 2 maart 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 14 februari 2016, ontvangen op 2 maart 2016 en aangevuld op 11 april 2016;
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 29 maart 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Dosis bepaling/bevestiging van bewezen neurovirulent influenza virus in muizen (3.4.4.1)	Muizen (Mus musculus)	110	100,00 % Matig	
Veiligheid van influenza vaccin: Neurovirulentie in muizen(3.4.4.2)	Muizen (Mus musculus)	120	33,30% Matig 66,70% Licht	
Veiligheid van influenza vaccin: Bevestiging van verzwakte fenotype in de longen van fretten(3.4.4.3)	Fretten (Mustela putorius furo)	240	100,00% Matig	

## **Voorwaarden**

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

#### **Specifieke voorwaarde:**

De vergunning wordt afgegeven onder de voorwaarde dat de neurovirulentie proeven (3.4.4.1 en 3.4.4.2) in beide geslachten uitgevoerd worden. Indien gedurende het project blijkt dat er overige geslachts-specifieke effecten zijn, kunt u deze informatie als wijziging rapporteren aan de CCD. Deze informatie kan voor de CCD aanleiding zijn om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten te wijzigen of in te trekken. Indien voorafgaand aan de proeven al informatie in de literatuur beschikbaar is waaruit blijkt dat een model of proces geslachtsafhankelijk zou zijn, is het ook mogelijk om deze informatie te gebruiken om wetenschappelijk te onderbouwen dat het gebruik van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren niet zou leiden tot het behalen van de doelstelling en dit aan ons te rapporteren.

#### **Algemene voorwaarden:**

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..

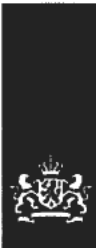
Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

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.

Inventaris Wob-verzoek W16-22S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2015413</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel oud			x					
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud			x					
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	DEC-advies				x		x	x	
9	Projectvoorstel herzien			x					
10	Niet-technische samenvatting herzien	x							
11	Bijlage beschrijving dierproeven 1 herzien			x					
12	Bijlage beschrijving dierproeven 2 herzien			x					
13	Bijlage beschrijving dierproeven 3 herzien			x					
14	Advies CCD		x						x
15	Beschikking en vergunning				x		x	x	



31 MAART 2016

### 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](http://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 | 90500  
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

Naam instelling of organisatie | BioXpert B.V.  
 Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [Redacted]  
 KvK-nummer | 54838134

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 | Nistelrooise Baan | 3  
 Postbus |  
 Postcode en plaats | 5374RE | Schaijk  
 IBAN | NL72RABO0183605888

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

Tenaamstelling van het rekeningnummer | BioXpert BV  
 (Titel) Naam en voorletters | [Redacted] |  Dhr.  Mw.  
 Functie | [Redacted]  
 Afdeling | [Redacted]  
 Telefoonnummer | [Redacted]  
 E-mailadres | [Redacted]

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

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



- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters  Dhr.  Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging mee met deze aanvraag*
- Nee

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 5 - 2016
- Einddatum 30 - 4 - 2021
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Uittesten van veiligheid van respiratoire humane challenge virussen in verschillende proefdier modellen
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Testen van de veiligheid van bovenste luchtweg virussen bestemd voor humaan gebruik in muizen, katoenratten en fretten.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC
- Postadres
- E-mailadres

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1441 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*  
 Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

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


## 6 Ondertekening


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

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

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


- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam 

Functie 

Plaats Schaijk

Datum 29-03 - 2015

Handtekening 



## Format

### Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

In het kader van de ontwikkeling van interventie strategieën tegen respiratoire virussen (in het bijzonder influenza, respiratoir syncytieel virus en rhinovirus) biedt de aanvrager van dit projectvoorstel verschillende preklinische modellen aan om de veiligheid van deze interventie strategieën uit te testen. Daarnaast kunnen deze modellen ook gebruikt worden om virus stocks van bovengenoemde virussen uit te testen op hun veiligheid voor humaan gebruik (zogenaamde humane challenge modellen). Deze preklinische modellen zijn door de aanvrager opgezet of voor de aanvrager beschikbaar en kunnen gebruikt worden om virus stocks verschaft door derden (in het algemeen farmaceutische bedrijven), maar ook in huis geproduceerd uit te testen.

Bovengenoemde virussen zorgen jaarlijks voor een grote ziektelast ondanks het feit dat er bijvoorbeeld een actief jaarlijks vaccinatie beleid is tegen seizoens influenza. Tot een aantal jaar geleden werden interventie strategieën alleen uitgetest in preklinische modellen, echter in de afgelopen jaren is zeker voor relatief milde respiratoire virus infecties ook het humane challenge model in opkomst. Het grote voordeel van dit model is de controleerbaarheid van de studie. Dit in tegenstelling tot een grote klinische studie waarbij het moeilijk is om te voorspellen bij welk aantal deelnemers significantie bereikt wordt in de test resultaten tussen specifiek behandelde en placebo behandelde deelnemers. Daarbij is het soms onduidelijk of de betreffende deelnemer een infectie heeft opgelopen omdat een actief virologisch screeningsbeleid op alle deelnemers logistiek moeilijk is. Bij een humane challenge waarbij een interventie strategie uitgetest wordt, kunnen de deelnemers uitvoerig gescreend worden en is van alle deelnemers bekend of ze geïnfecteerd zijn en dus of de interventie strategie gewerkt heeft.

De virussen die tot nu toe hiervoor in aanmerking komen zijn:

- Milde humane influenza virussen (zogenaamde seizoens influenza virussen)
- Humaan respiratoir syncytieel virus
- Humaan rhinovirus

Van deze bovenstaande virussen moeten voor de humane challenge speciale virusstocks opgegroeid worden in geschikte en goedgekeurde cellijnen. Het is echter niet gegarandeerd dat het relatief milde karakter voor opgroeien in vitro nog van toepassing is na het maken van de humane challenge stock. Alhoewel de mutatie frequentie van deze RNA virussen in het algemeen relatief hoog is zeker onder druk van het immuunsysteem, is dit minder van toepassing voor in vitro opgroeien van virus. Desondanks dienen dergelijk opgegroeide virusstocks uitgetest te worden op hun veiligheid al dan niet in vergelijking met het oorspronkelijke donor virus. Deze laatste keuze zal voornamelijk bepaald worden op beschikbaarheid van dit oorspronkelijke virus. Indien dit een primair isolaat is van een patiënt zal meestal niet voldoende materiaal aanwezig zijn of is de titer van het materiaal niet hoog genoeg om het ook in een dierstudie te gebruiken. Betreft het reeds een bestaande virus stock, dan zou het kunnen zijn dat het oorspronkelijke virus wel degelijk meegenomen kan worden. Indien het oorspronkelijke virus niet beschikbaar is, zal een vergelijkbaar virus (positieve controle) meegenomen worden ter controle.

De lage pathogeniciteit van de opgegroeide challenge stock voor humaan gebruik dient bevestigd te worden in één of meerdere diermodellen, waarbij het kleinste diermodel gekozen wordt dat het meest representatief is voor de gekozen primaire uitleesparameter. In het algemeen staat omschreven in de Pharmacopeia waaraan degelijk biologische reagentia voor humaan gebruik moeten voldoen, maar voor deze specifieke vraagstelling bestaan geen vereisten. Als richtlijn zullen opgegroeide virus stocks voor humane challenge niet pathogener mogen zijn of niet leiden tot hogere viral load dan het oorspronkelijke virus of de positieve controle. Op basis van de resultaten verkregen in de verschillende dierexperimente, die beschreven zijn in deze aanvraag, kan een uitspraak gedaan worden over de veiligheid van de hier uit te testen virus stocks. In het geval van een humane influenza virus stock bestaat een wetenschappelijke publicatie van Memoli et al. (Clinical Infectious Diseases 2015, Appendix 1) waarin omschreven staat hoe de auteurs het betreffende virus hebben uitgetest. Voor de andere twee bovengenoemde virussen bestaat niet zo'n richtlijn/publicatie, echter gepubliceerd werk en eigen onderzoek heeft wel de gevoeligheid van de voorgedragen diermodellen voor deze virussen bevestigd.

De experimenten zoals hier beschreven hebben een kwantitatief karakter, resultaten verkregen binnen

de experimenten met verschillende doses van het virus of tussen het oorspronkelijke virus (al dan niet uit historische resultaten) en het opgegroeide virus zullen direct met elkaar vergeleken worden. De voorwaarde voor alle experimenten ongeacht de primaire uitleesparameter zal zijn dat de virus stock voor humane challenge geen significant hogere bevindingen wat betreft virulentie of pathogeniciteit mag hebben dan het oorspronkelijke virus of de meegenomen positieve controle. Deze bevindingen zijn afhankelijk van het virus en het gekozen diermodel.

### 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?

De algemene doelstelling van het project is het uittesten van de veiligheid van humane respiratoire virussen voor humane challenge door middel van een kwantitatieve bepaling. De primaire uitleesparameter zal afhangen van de combinatie van preklinisch model en virus. Per combinatie van preklinisch model en virus is de primaire uitleesparameter beschreven in de verschillende bijlagen bij dit projectvoorstel. Voor de kleine diermodellen (muizen en katoenratten) zal de primaire uitleesparameter de virologie zijn, namelijk viral load in de longen na infectie. Voor de fretten zal de primaire uitleesparameter pathologie zijn in de longen.

Dit soort studies worden door de aanvrager uitgevoerd om te kunnen voldoen aan de vraag van derden om de veiligheid van humane respiratoire virussen voor humaan gebruik uit te testen en om advies uit te brengen richting regelgevende instanties. Vanwege de grote expertise van de aanvrager op het gebied van humane respiratoire virussen en haar relevante preklinische modellen kunnen dergelijke studies ook leiden tot publicatie in peer-reviewed tijdschriften. Deze expertise leidt tot een toename van de kwaliteit van het te gebruiken model en het ontwikkeltraject van de betreffende interventie strategie.

### 3.3 Belang

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

Virale bovenste luchtweginfecties zorgen jaarlijks voor een hoge ziektelast en deze zorgen voor een hoge economische schade. Als voorbeeld: voor alleen de Verenigde Staten, een samenleving vergelijkbaar met West-Europa, is uitgerekend dat de economische schade voor niet-influenza bovenste luchtweg infecties op kan lopen tot 40 miljard dollar (Fendrick Archiv Intern Med 2003). Hierin zijn (al dan niet effectieve en relevante) directe medische kosten meegenomen, maar ook indirecte kosten, zoals bijvoorbeeld het opnemen van vrije dagen door ouders met kinderen die een infectie doormaken. Daarbovenop kunnen bij de zogenaamde risicogroepen (baby's, jonge kinderen, bejaarden, chronisch zieken en patiënten met een verzwakt afweersysteem) ernstige complicatie optreden en zelfs sterfte voorkomen.

Vanwege het feit dat deze bovenste luchtweginfecties een hoge ziektelast en een hoge economische schade veroorzaken, zoeken farmaceutische bedrijven naar interventie strategieën om deze te verlagen. Tevens kunnen deze interventie strategieën ook ingezet worden bij ernstigere ziektebeelden in risico groepen.

Hoewel het uittesten in preklinische modellen een belangrijke stap is in de vrijgave van dergelijke interventie strategieën, wordt steeds vaker het humane challenge model gebruikt in dergelijk onderzoek. Hierbij speelt ook mee dat deze relatief milde infecties ook een beperkt ziektebeeld vertonen in de verschillende preklinische modellen, waardoor het soms lastig is om een behandelingseffect aan te tonen in deze niet natuurlijke gastheren.

De resultaten verkregen in de dierproeven beschreven in dit project voorstel zullen gebruikt worden om

de veiligheid van humane respiratoire virussen voor gebruik in de mens te rapporteren aan de regelgevende instanties. Bij bewezen veiligheid kunnen deze humane respiratoire virussen ingezet worden voor het uittesten van interventie strategieën in de mens. Indien in de mens aangetoond kan worden dat de uit te testen interventie strategie effectief is, zullen de verkregen resultaten gebruikt worden in het registratie proces van die betreffende interventie strategie.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het doel van deze projectaanvraag is het uitvoeren van vereiste veiligheidstesten van humane respiratoire virussen welke in het humane challenge model gebruikt kunnen worden.

Voor de verschillende virussen in de verschillende preklinische modellen zal op een kwantitatieve manier beoordeeld worden of de virus stock voor humaan gebruik veilig is. Hiertoe zal de voor die betreffende combinatie van virus en diermodel een primaire uitleesparameter gekozen worden (virologie of pathologie), welke gelijkwaardig of verminderd pathogeen moet zijn dan het oorspronkelijke virus of de meegenomen positieve controle.

#### 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 alle hier voorgelegde dierproeven zal bepaald worden of een nieuw opgegroeide virus stock vergelijkbaar of verminderd pathogeen is dan het oorspronkelijke virus. Deze bepaling zal op een kwantitatieve manier uitgevoerd worden en per dierproef (combinatie van diermodel en virus) zal bepaald worden wat de primaire uitleesparameter is. Indien van toepassing kan het zijn dat een positieve controle (oorspronkelijke virus of vergelijkbaar relevant virus) en/of een negatieve controle meegenomen wordt. Een dergelijke negatieve controle is om aan te tonen dat bij gelijke (be)handelingen geen effect wordt waargenomen, die toegeschreven kan worden aan de behandeling. Hierbij kan gedacht worden aan meer conventionele modellen, zoals de fret, waarbij bijvoorbeeld minimale macroscopische schade aan de longen inherent is aan het model en niet te wijten is aan de infectie met het virus. Indien mogelijk zullen resultaten van de positieve controle verkregen worden uit reeds uitgevoerde experimenten met het betreffende virus om tegemoet te komen aan vermindering van proefdiergebruik.

#### 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.

De verschillende onderdelen dienen allemaal hetzelfde doel, namelijk onderzoek naar de veiligheid van een humaan respiratoir virus voor gebruik in mensen. Afhankelijk van de primaire uitleesparameter zal een keuze gemaakt worden tussen de verschillende modellen zoals beschreven in de verschillende modules, indien meerdere modellen beschikbaar zijn. Daarnaast is het wel zo dat als in het gekozen model verhoogde virulentie of pathogeniciteit geobserveerd wordt, het betreffende virus gediskwalificeerd wordt voor humaan gebruik.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Veiligheid van influenza virus voor humaan gebruik
2	Veiligheid van respiratoir syncytieel virus voor humaan gebruik
3	Veiligheid van rhinovirus voor humaan gebruik
4	
5	
6	
7	
8	

9	
10	

## Format

### Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

## 1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Testen van de veiligheid van bovenste luchtweg virussen bestemd voor humaan gebruik in muizen, katoenratten en fretten.
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Muizen, fretten, katoenratten, virus, veiligheid

## 2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.  <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input checked="" type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

## 3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Bovenste luchtweginfecties door virussen zorgen jaarlijks voor een hoge ziektelast en dit leidt tot een hoge economische schade. Voor bijvoorbeeld de Verenigde Staten, een samenleving vergelijkbaar met West-Europa, is uitgerekend dat de economische schade voor niet-griep gerelateerde bovenste luchtweg infecties op kan lopen tot 40 miljard dollar. Hierin zijn (al dan niet effectieve en relevante) directe medische kosten meegenomen, maar ook indirecte kosten, zoals bijvoorbeeld het opnemen van vrije dagen door ouders met kinderen die een infectie doormaken. Daarbovenop kunnen bij de zogenaamde risicogroepen (baby's, jonge kinderen, bejaarden, chronisch zieken en patiënten met een verzwakt afweersysteem) ernstige complicatie optreden en zelfs sterfte voorkomen.</p> <p>Vanwege het feit dat deze bovenste luchtweginfecties een hoge ziektelast en een hoge economische schade veroorzaken, zoeken farmaceutische bedrijven naar vaccins/medicijnen om deze te verlagen. Tevens kunnen deze vaccins/medicijnen ook ingezet worden bij ernstigere ziektebeelden in risico</p>
---	--



groepen.  
Tot een aantal jaar geleden werden vaccins/medicijnen alleen uitgetest in proefdieren, echter in de afgelopen jaren is zeker voor relatief milde luchtweg infecties door virussen ook de mens zelf als studie object in opkomst. Het grote voordeel hiervan is de controleerbaarheid van de studie. Indien een grote klinische studie opgezet wordt, is het moeilijk om te voorspellen bij welk aantal deelnemers significantie bereikt wordt in de test resultaten tussen specifiek behandelde en placebo behandelde deelnemers. Daarnaast is het zo dat het soms onduidelijk is of de betreffende deelnemer een infectie heeft opgelopen omdat een actieve screening op virussen op alle deelnemers logistiek moeilijk is. Bij een humane challenge waarbij een vaccin of medicijn uitgetest wordt, kunnen de deelnemers uitvoerig gescreend worden en is van alle deelnemers bekend of ze geïnfecteerd zijn en dus of het middel gewerkt heeft.

Vanuit de regelgevende instanties wordt gesteld dat dergelijke virussen die gebruikt zullen worden in de mens, moeten worden getest op veiligheid. De experimenten omschreven in deze aanvraag hebben tot doel om deze veiligheid uit te testen.

- |   |  |
|---|--|
| 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | De resultaten verkregen in deze studie zullen bijdragen aan de kennis over de veiligheid van milde luchtweg virussen die gebruikt kunnen worden in de mens. Resultaten uit dit soort studies zullen gebruikt kunnen worden voor de vrijgifte van de uit te testen virussen.  |
| 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?  | Muizen: 1200<br>Fretten: 900<br>Katoenratten: 900  |
| 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?                                     | Door toediening van de verschillende preparaten kunnen de dieren last krijgen van luchtweg verschijnselen en in het geval van griepvirussen neurologische verschijnselen. De negatieve gevolgen zijn tot een minimum beperkt aangezien virussen voor gebruik in de mens ook in de mens slechts milde ziekte verschijnselen vertonen. |
| 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?   | In alle experimenten is het maximale ongerief ingeschat als licht.   |
| 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?   | Overlevende dieren zullen na afloop van de studie gedood worden om in verschillende weefsels te bepalen hoeveel virus erin zit en of er schade aantoonbaar is.   |

## 4 Drie V's

### 4.1 **Vervanging**

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

De studies welke uitgevoerd worden onder dit project zijn opgezet om de veiligheid van luchtweg virussen voor gebruik in de mens te bestuderen. Dergelijke studies zijn niet mogelijk zonder diermodellen met een intact afweersysteem. Er zal voorafgaand wel proefdier-vrij onderzoek uitgevoerd worden om te bestuderen of er aanwijzingen zijn dat het betreffende virus niet veilig is.

### 4.2 **Vermindering**

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Voor zover mogelijk zullen resultaten uit eerdere studies of gepubliceerde resultaten gebruikt worden voor een bepaling van de groepsgrootte. Daarnaast is het zo dat binnen de studies resultaten van verschillende dagen met elkaar vergeleken worden, waardoor het aantal dieren laag gehouden kan worden.

### 4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en).  
Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

De keuze voor de verschillende diermodellen is bepaald vanuit de gevoeligheid voor een bepaald virus en de primaire uitleesparameter. Voor elke studie zal het kleinst mogelijke diermodel, dat beschikbaar is, gebruikt worden. Indien mogelijk zal een eerste bepaling uitgevoerd worden in het kleinst mogelijke diermodel, waarna kandidaat virussen uitgetest worden in een klinisch relevanter model.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

De dieren worden standaard gehuisvest in groepen met kooiverrijking en minimaal eenmaal per dag gecontroleerd. De meest ingrijpende handelingen zullen uitgevoerd worden onder verdoving. Als de dieren een bepaalde ziektebeeld gaan vertonen (luchtwegproblemen) of als verwacht wordt dat ze snel meer verschijnselen zullen gaan vertonen, zullen de dieren intensiever geobserveerd worden.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

---

## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	90500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Veiligheid van influenza virus voor humaan gebruik

*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.

Voor het onderzoek naar influenza virussen is het ook mogelijk om gebruik te maken van gezonde vrijwilligers in plaats van proefdieren. Om de veiligheid van deze vrijwilligers te waarborgen is het van belang dat de virussen waarmee ze worden geïnfecteerd van te voren worden getest op virulentie en pathogeniciteit. Bij de productie van een virus stock voor gebruik in de mens wordt het betreffende virus in vitro opgegroeid. Om te kunnen garanderen dat het virus dat de mens in gaat nog steeds hetzelfde fenotype heeft, zal deze eerst in dieren getest moeten worden. Dergelijke vereisten zijn in het algemeen omschreven in de Pharmacopeia, vertaald door Memoli et al (Clinical Infectious Diseases 2015, Appendix 1) en toegepast in de genoemde publicatie voor wat betreft het uittesten van influenza virus in muizen. Voor influenza zijn verschillende diermodellen beschikbaar, die al dan niet translationeel zijn naar de mens. Het kleinst mogelijke model is de muis en alhoewel het klinische beeld niet overeenkomt met dat van de mens en muizen verminderd vatbaar zijn voor niet muis-geadapteerde influenza stammen, kan dit model wel gebruikt worden om de virus replicatie te bestuderen in de longen. Dit model kan beschouwd worden als een eerste keuze model, waarna voor een meer klinisch relevant model gekozen kan worden voor een kandidaat virus voor humaan gebruik. Indien meerdere kandidaat virus stocks beschikbaar zijn kan in het muizenmodel een eerste selectie gemaakt worden op basis van virulentie. Virus stocks die meer virulentie vertonen dan de controle (het oorspronkelijke virus of de meegenomen relevante positieve controle), zullen uitgesloten worden voor humaan gebruik en dus niet verder getest worden in het frettenmodel (NO GO). Kandidaat virus stock(s) die verminderde of gelijke virulentie vertonen in vergelijking met de controle kan (kunnen ) vervolgens uitgetest worden in het fretten model (GO). Dit frettenmodel is een meer relevant model, waarbij de aanhechting van het virus, het ziekteverloop en de uiteindelijke pathologie vergelijkbaar is met de mens. Resultaten verkregen in het frettenmodel zijn leidend voor de veiligheid in de mens en bij

verminderde of gelijke pathologie in vergelijking met de controle kan de betreffende virus stock vrijgegeven worden voor gebruik in de mens (GO). Bij verhoogde pathologie in vergelijking met de controle zal het betreffende virus alsnog gediskwalificeerd worden voor gebruik in de mens (NO GO).

Zoals hierboven genoemd is de primaire uitkomst parameter in deze experimenten afhankelijk van het gekozen diermodel. Deze is voor de verschillende modellen:

- Muizen: virus replicatie in de longen (virulentie)
- Fretten: long pathologie (pathogeniciteit)

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.

**Muizen:**

Nadat de dieren zijn aangekomen binnen de faciliteit zullen ze een acclimatisatie periode hebben van minimaal 1 week. Dieren worden voor de proef gewogen, geïdentificeerd door middel van oorknip en er wordt bloed afgenomen via de wangprik (~100ul) voor serum (het zogenaamde nul-monster). Deze hoeveelheid serum (~50ul) is voldoende om in het geval van onverwachte resultaten op basis van serologie uit te sluiten dat de dieren op voorhand een immunologische respons hadden die van invloed zou kunnen zijn op de infectie. Daarnaast zal dit nul-monster ook dienen als referentie in de serologische analyses. Nadat de dieren zijn gesedeerd (isofluraan 3-4%), worden de dieren intranasaal (50µL) geïnoculeerd. Op een aantal vroege tijdstippen na inoculatie wordt een aantal dieren van iedere groep geëthanaseerd, waarna de longen worden verzameld. Deze vroege tijdstippen zijn gekozen om tijdens de log-fase van de virus replicatie te bestuderen of er verschillen zijn tussen de verschillende doseringen/virussen op basis van virulentie en pathologie. Het tijdstip van deze vroege momenten zal afhangen van het betreffende virus en zal bepaald worden op basis van reeds beschikbare data of via literatuur onderzoek. De overgebleven dieren worden aan het einde van het experiment (dag 14) geëthanaseerd en ook hier worden de longen verzameld voor virologie en pathologie. Dit late tijdstip is gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. Het eerste (verlengde uitscheiding van het virus) zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus. Tijdens de gehele studie worden de dieren dagelijks gewogen en wordt er gekeken naar klinische verschijnselen. Daarnaast zullen dieren vroegtijdig uit de studie worden gehaald indien het humane eindpunt wordt bereikt. Hieronder is een voorbeeld van een dergelijke studie waarin een bepaald(e) influenza virus (dosis) getest wordt in muizen. Daarnaast zal in een dergelijke studie een negatieve en een positieve controle meegenomen worden. De positieve controle dient om de vergelijking te maken met het uit te testen virus en de negatieve controle als nul-referentie ten opzichte van de geïnfecteerde dieren. Voor beide controles zal het tijdstip van euthanasie beschreven en beargumenteerd worden in het werkprotocol.

Group		No/Group	Infection phase																		
		d -7																			
			d -1	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14			
1	6	entry of animals in the preclinical facility	C,W, B	Intranasal Administration of influenza virus, C, W	C,W	C,W	C, B, W, Euthanasia, T														
2	6						C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T												
3	6						C, W	C, W	C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T										
4	6						C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W
HOUSING		DM-II	DM-II																		

\* W = body weight, B = blood for serum, C = clinical scoring, T = tissue;

**Fretten:**

Nadat de dieren zijn aangekomen binnen de faciliteit zullen ze een acclimatisatie periode hebben van minimaal 1 week. Minimaal 14 dagen voor de start van het experiment zal een zgn. nul-bloedmonster voor referentie in analyses afgenomen worden onder sedatie via de vena jugularis. Dit serum zal gebruikt worden om in het geval van onverwachte resultaten op basis van serologie

uit te sluiten dat de dieren op voorhand een immunologische respons hadden die van invloed zou kunnen zijn op de infectie. Daarnaast zal dit nul-monster ook dienen als referentie in de serologische analyses. Hierna zal een datalogger ingebracht worden. Dit zal gebeuren door middel van een operatie waarbij de buikwand geopend zal worden en de temperatuurlogger via de linea alba in de peritoneale holte geplaatst zal worden waarna de wond gehecht wordt. Deze datalogger meet de lichaamstemperatuur en/of activiteit van het dier gedurende de looptijd van de studie (klinische parameter). Peri- en postoperatief zullen de dieren topicale pijnbestrijding krijgen om het genezingsproces te bevorderen en na afloop van de operatie zal de werking van de anesthesie geantagoneerd worden. Op dag -1 zullen alle dieren gewogen en bemonsterd (neus en keel) worden en op dag 0 via de intranasale route geïnoculeerd worden met een volume van 300ul. Het nul-monster wordt een dag voor de daadwerkelijke inoculatie uitgevoerd om geen interferentie te hebben met de inoculatie zelf. Aangezien hier een uitspraak gedaan zal worden over de veiligheid in gebruik bij de mens, wordt ook de route identiek gehouden (ter vergelijking: een dergelijk challenge in mensen wordt ook via de intranasale route gegeven). Na infectie zal de anesthesie geantagoneerd worden en zullen de dieren dagelijks bemonsterd worden uit de bovenste luchtwegen (keel en neus) onder anesthesie en zal de Body Score Index bepaald worden. Bij makkelijk palpabele ribben zal besloten worden om vanuit welzijnsstandpunt de dieren te wegen tijdens hetzelfde anesthesie moment. Op gezette tijden na infectie (of eerder indien een dier het humane eindpunt bereikt) zullen dieren geëthanaseerd worden voor het verzamelen van relevant weefsel. De overgebleven dieren worden aan het einde van het experiment (dag 14) geëthanaseerd en ook hier worden de longen verzameld. Dit late tijdstip is gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. Het eerste (verlengde uitscheiding van het virus) zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus. Daarnaast zullen de dieren dagelijks tot het einde van de proef geobserveerd worden om te bepalen of er klinische verschijnselen te zien zijn. Hieronder is een voorbeeld van een dergelijke studie waarin twee (verschillende doses van een) influenza virus getest worden in fretten in vergelijking met negatieve en een positieve controle. De route van de negatieve danwel positieve controle kan afwijken van de route voor de uit te testen virus stock (bijvoorbeeld intratracheaal of zowel intratracheaal als intranasaal), dit zal op geleide van historische gegevens gaan en zal beargumenteerd worden in het werkprotocol.

		Preparation*		Challenge & Sampling**																																				
Group	No/Group	d -21	d -14**	d -1	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14																					
1	3	entry of animals into the preclinical facility	W Implantation data logger, B*	C, S, W	Negative control	C, S	C, S	C, S	C	C, S	C	C	C	C, S	C	C	C	C	C	C, B, S, Euthanasia, T																				
2	3																				C, S, Euthanasia, T																			
3	3																				C, S	C, S	C, S, Euthanasia, T																	
4	3																				Virus (dose) 1	C, S	C, S	C, S	C	C, B, S, Euthanasia, T														
5	3																										C, S	C, S	C, S	C	C, S	C	C	C, S	C	C	C	C	C	C
6	3																				Virus (dose) 2	C, S, Euthanasia, T	C, S	C, S	C, S	C	C, B, S, Euthanasia, T													
7	3																											C, S	C, S	C, S	C	C, S	C	C	C, S	C	C	C	C	C
8	3																				Positive control	C, S	C, S	C, S	C	C, B, S, Euthanasia, T														
9	3																										C, S	C, S	C, S	C	C, S	C	C	C, S	C	C	C	C	C	C
10	3																				C, S	C, S	C, S	C, S	C, S	C, S	C, S	C, S	C, S	C, S	C, S	C, S	C, S	C, S	C, S	C, S	C, S	C, S	C, S	C, S
HOUSING		DM-I/II		DM-II/isolator																																				

Animals seronegative for circulating Influenza viruses and Aleutian Disease will be brought into the animal facility  
 \* S = nose & throat swabs, B = blood for serum, C = clinical scoring, W = body weight, T = tissue;  
 \*\* all animals will be implanted with a pre-programmed data logger

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

**Muizen:**

Aangezien het hier nieuwe influenza virussen betreffen welke nog niet uitgetest zijn in het muizen model is nog geen spreiding van de resultaten bekend op het gebied van virale load in de longen (primaire uitleesparameter in het muizenmodel). Er kan dus geen exacte statistische berekening

gedaan worden over de groepsgrootte. Als er gekeken wordt naar de publicatie van Overbaugh en Richardson (J. Virology 2005) is gekozen voor een groepsgrootte per euthanasie moment van 6 dieren, bij deze groepsgrootte zal een outlier binnen een groep geen invloed hebben op de significantie. Indien reeds data beschikbaar is van het betreffende wild-type virus, kan dit wel gebruikt worden voor een power berekening en zal dit in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD. Wel is al beschreven dat met deze aantallen dieren een significante uitspraak gedaan kan worden over de replicatie kinetiek van het opgegroeide virus voor humaan gebruik in vergelijking met het oorspronkelijke virus in muizen (Memoli et al Clinical Infectious Diseases 2015).

#### **Fretten:**

Aangezien het hier nieuwe influenza virussen betreffen welke nog niet uitgetest zijn in het fretten model is nog geen spreiding van de resultaten bekend op het gebied van de pathologie (primaire uitleesparameter in het frettenmodel). Er kan dus geen exacte statistische berekening gedaan worden over de groepsgrootte. Per euthanasie moment zullen drie dieren gebruikt worden. Aangezien in dit experiment de verschillende groepen met elkaar vergeleken kunnen worden, is het mogelijk om de experimenten met een dergelijk laag aantal dieren per groep uit te voeren. Eerdere vergelijkbare experimenten (dose-finding van influenza virussen in fretten) hebben laten zien dat met dergelijke kleine groepen een goed onderbouwde keuze gemaakt kan worden over de dosis van het betreffende virus. De verwachting is dat in deze experimenten dergelijke aantallen ook voldoende zijn om te komen tot een gedegen uitspraak in de resultaten. Indien reeds data beschikbaar is van het betreffende wild-type virus, kan dit wel gebruikt worden voor een power berekening en zal dit in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD.

#### **B. De dieren**

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

##### **Diersoort:**

- **muizen (stam nader te bepalen):** vrouwelijk of mannelijk van 6-8 weken oud. Reeds gepubliceerd onderzoek zal basis zijn voor de keuze van de muizenstam, de leeftijd en het geslacht voor het betreffende virus. Indien deze voorkennis niet beschikbaar is, zal naar homologie gekeken worden voor de meest gevoelige muizenstam en het betreffende geslacht.
- **Fretten:** fretten, mannelijk of vrouwelijk van 4-8 maanden oud. Fretten zijn gevoelig voor infectie met wild-type klinische relevante influenza virussen en derhalve worden fretten bijvoorbeeld ook regelmatig gebruikt voor het genereren van antisera voor het typeren van influenza virussen. Daarnaast zijn de klinische verschijnselen geobserveerd in fretten overeenkomstig met de klinische verschijnselen in mensen. Voor deze experimenten zullen vrouwelijke of mannelijke dieren gebruikt worden en de keus voor een bepaald geslacht zal bepaald worden door de beschikbaarheid van de verschillende geslachten. De beschikbaarheid van een gevalideerd model is minder van toepassing in deze dierproeven aangezien binnen deze experimenten de verschillende groepen 1:1 vergeleken worden met elkaar. Daarnaast zijn de groepen dusdanig klein in deze experimenten, dat met dergelijke aantallen niet gewerkt kan worden met gemixte groepen van mannelijke en vrouwelijke dieren. Het gebruik van gemixte groepen zal altijd gepaard gaan met grotere aantallen en is niet wenselijk in het kader van vermindering.

##### **Herkomst:** geregistreerde proefdierfokker

- Fretten: Er is een jarenlange relatie met de betreffende fokker en in overleg met de aanvrager is een huisvestingsregime opgesteld dat de influenza-specifieke seronegativiteit van de dieren waarborgt. Dit laatste garandeert dat de dieren ook daadwerkelijk geïnfecteerd kunnen worden.

##### **Geschatte aantal:**

- Muizen: 1200 dieren in 5 jaar. Er wordt verwacht om een dergelijke studie 4 keer per jaar uit te voeren voor een bepaald virus in twee verschillende doseringen met per dosering vier verschillende euthanasie momenten t.o.v. een positieve en een negatieve controle die beide een enkel euthanasie moment hebben, dus een totaal aantal van 4 studies x 10 groepen van 6 dieren x 5 jaar = 1200 dieren
- Fretten: 600 dieren in 5 jaar. Er wordt verwacht om een dergelijke studie 4 keer per jaar

uit te voeren voor een bepaald virus in twee verschillende doseringen met per dosering vier verschillende euthanasie momenten t.o.v. een positieve en een negatieve controle die beide een enkel euthanasie moment hebben, dus een totaal aantal van 4 studies x 10 groepen van 3 dieren x 5 jaar = 600 dieren

Bij de berekening van de aantallen is rekening gehouden met het feit dat elk jaar 4 verschillende influenza virussen circuleren (2xA en 2xB) en deze vertegenwoordigd zijn in het vaccin. Effectiviteit dient dus uitgetest te worden tegen alle vier de circulerende virussen, vandaar dat een dergelijke studie 4 keer per jaar wordt uitgevoerd.

### 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.

**Vervanging:** deze experimenten zijn opgezet om te bepalen of de virus stock die geproduceerd is voor gebruik in de mens vergelijkbaar of minder pathogeen is dan het oorspronkelijke virus. Eerste resultaten zullen verkregen worden in vitro, waarbij bestudeerd wordt of het virus een andere groei kinetiek vertoont. Bij verhoogde groei kinetiek kan besloten worden om het in vivo experiment niet uit te voeren (GO/NO GO beslissing). Voor het bepalen van de pathogeniciteit en replicatie in de luchtwegen is het intacte dier benodigd en daarom is dit in vitro niet na te bootsen.

**Vermindering:** voorafgaand aan het in vivo experiment, zal het virus in vitro bestudeerd worden om te bepalen of de kinetiek van de virus stock afwijkt van het oorspronkelijke virus. Indien een verhoogde replicatie/pathogeniciteit (in vitro) geobserveerd wordt, kan besloten worden om de betreffende stock niet uit te testen in vivo. Bovengenoemde groepsgrootte is bepaald op basis van verwachtingen, echter indien al in vivo resultaten beschikbaar zijn voor het betreffende virus zal dit gebruikt worden voor een nieuwe power berekening. Deze zal in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD.

**Verfijning:** Meest invasieve behandelingen zullen uitgevoerd worden onder sedatie en dieren worden dagelijks geobserveerd. Indien de klinische symptomen daartoe aanleiding geven (vertonen van ademhalingsproblemen) zullen de dieren frequenter geobserveerd worden. Zo kan voorkomen worden dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment. Als er meerdere kandidaat influenza virussen zijn, zullen deze in eerste instantie het muizenmodel bestudeerd worden. Op basis van de resultaten in deze studies kan besloten worden om bepaalde influenza virussen wel (GO) of niet (NO GO) uit te testen in het frettenmodel. In het algemeen zullen alleen laag-pathogene virussen gebruikt worden in het humane challenge model, dit zal dus ook in het frettenmodel tot zeer beperkt ongerief leiden en aangezien deze virussen niet muis-geadapteerd zijn, zal het veroorzaakte ongerief ook beperkt zijn in het muizenmodel. Echter, tijdens de challenge fase kunnen klinische symptomen zeer snel tot uiting komen omdat de replicatie van influenza een logaritmische curve doormaakt. Zo kan bijvoorbeeld aan het eind van de dag besloten worden om laat op de avond nog een extra controle tijdstip in te voegen vanwege dierwelzijnsstandpunt om te voorkomen dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment.



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

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt worden door het feit dat de dieren gehuisvest zullen worden na infectie onder klasse II of klasse III inperking. Afval (bedding, kadavers en andere gebruikte materialen) zal aangeboden worden voor destructie.

## 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.

n.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Na de operatieve plaatsing van de temperatuur loggers bij fretten zullen de dieren peri- en post operatief pijnbestrijding krijgen (meloxicam). Als gevolg van de infectie en vervolgens replicatie van het virus in de luchtwegen, is de inschatting dat de dieren geen pijn zullen ondervinden.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Andere verschijnselen die de dieren kunnen vertonen, maar die niet gepaard gaan met pijn zijn:

- zijn algemene verschijnselen: gewichtsverlies en verminderd actief bij stimulatie
- respiratoire verschijnselen: een verhoogde ademhalingsfrequentie (deze zal bij verergering overgaan in stokkende/schokkende ademhaling)
- neurologische verschijnselen: verstoorde locomotie zoals een instabiele gang en/of ongecontroleerde bewegingen (deze zal bij verergering overgaan in verlamming (parese en paralyse)).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De klachten worden veroorzaakt door infectie met het influenza virus en vervolgens replicatie in de luchtwegen (respiratoire verschijnselen) of de hersenen (neurologische verschijnselen).

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

Behalve na implantatie van de temperatuur loggers in fretten, is de inschatting is dat de dieren binnen de studie geen pijn zullen ondervinden als gevolg van de infectie (zie ook H). Daarnaast is het zo dat de meest gangbare analgetica in het algemeen naast pijnstillende ook een ontstekingsremmende werking hebben en kunnen dus interfereren in de studie. Daarom is per definitie het gebruik van dergelijke analgetica niet mogelijk in deze experimenten vanwege verstoring van de primaire uitlees parameter.

## 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.

### Muizen:

De dieren zullen dagelijks geobserveerd worden en klinische scores worden genoteerd. Bij matig ongerief (zie hieronder de inschaling van de ongerief klassen) zal het betreffende dier uit de studie worden genomen. Deze klinische ongerief klassificaties zijn:

Licht: 2 algemene symptomen\*

Matig: 3 algemene symptomen\*

Ernstig: gewichtsverlies van >15% ten opzichte van gewicht bij aanvang van de proef

\* algemene symptomen: opgezette vacht, gebogen postuur en verminderd actief

### Fretten:

Tijdens de challenge fase kunnen infectie gerelateerde verschijnselen optreden welke leiden tot de volgende humane eindpunten. Bij het vertonen 1 van de volgende humane eindpunten (matig ongerief) zal het betreffende dier geëuthanaseerd worden:

1. Gewichtsverlies: na infectie worden de dieren dagelijks bemonsterd, waarbij ook de Body Score Index bepaald kan worden. Indien de dieren een voelbare vermagering hebben (ribben makkelijk palpabel), zullen ze vanuit welzijnsstandpunt dagelijks gewogen worden. Het humane eindpunt is gedefinieerd als het betreffende dier >10% gewicht verliest (geclassificeerd als matig ongerief) t.o.v. het startgewicht op de dag van challenge.
2. Respiratie: bij verergering van de ziekte zal de ademhaling veranderen van normale naar een verhoogde ademhalingsfrequentie (licht ongerief). Bij verergering van de symptomen naar stokkende / schokkende ademhaling zal het dier geëuthanaseerd worden (matig ongerief).
3. Diarree: indien in de huisvesting te zien is dat een of meerdere dieren diarree (geclassificeerd als matig) hebben, zullen alle dieren afzonderlijk beoordeeld worden om te bepalen of er aanwijzingen zijn (vuile vacht rond de anus) welke dieren daadwerkelijk diarree vertonen.

### Muizen/Fretten:

Bij de volgende verschijnselen zullen de dieren direct geëuthanaseerd worden (beide geclassificeerd als ernstig ongerief):

1. Neurologisch: in enkele gevallen kan het virus vanuit de neus van het dier doorslaan naar de hersenen en zo een ontsteking van de hersenen induceren. De daarbij behorende verschijnselen zijn onstabiele gang en ongecontroleerde bewegingen (zoals beschreven in Bodewes et al 2015 AJP).
2. Lethargie: indien een dier lethargisch is (m.a.w. als het niet meer reageert op externe prikkels).

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

100% van de dieren zullen licht ongerief vertonen als gevolg van de infectie met influenza virus. De verwachting is dat meer dan licht ongerief niet zal voorkomen (<5%) aangezien in het algemeen influenza virussen welke bedoeld zijn voor humane challenge alleen milde verschijnselen zullen vertonen en daarnaast zijn dit geen virussen welke geadapteerd zijn aan de muis, die na muis-adaptie meer pathogeen zijn dan het wild-type virus.

### K. Classificatie van ongerief

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

Het cumulatieve ongerief voor deze experimenten wordt ingeschaald op licht.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Om te controleren of het virus repliceert in de longen en wat de pathologische schade is in de longen, worden deze verwijderd en verder verwerkt voor onderzoek. Dit is niet mogelijk bij in leven laten van het dier.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	90500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	2	Veiligheid van respiratoir syncytieel virus voor humaan gebruik

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Voor het onderzoek naar respiratoir syncytieel virus (RSV) is het ook mogelijk om gebruik te maken van gezonde vrijwilligers in plaats van proefdieren. Om de veiligheid van deze vrijwilligers te waarborgen is het van belang dat de virussen waarmee ze worden geïnfecteerd van te voren worden getest op virulentie en pathogeniciteit. Bij de productie van een virus stock voor gebruik in de mens wordt het betreffende virus in vitro opgegroeid. Om te kunnen garanderen dat het virus dat de mens in gaat nog steeds het zelfde fenotype heeft, zal deze eerst in dieren getest moeten. Dergelijke vereisten zijn in het algemeen omschreven in de Pharmacopeia, vertaald door Memoli et al (Clinical Infectious Diseases 2015, Appendix 1) en toegepast in de genoemde publicatie voor wat betreft het uittesten van influenza virus in muizen. Dergelijke studies voor het uittesten van RSV zijn nog niet eerder beschreven in de literatuur en derhalve zijn de studies zoals beschreven in dierproef 1 als richtlijn gebruikt voor het uittesten van RSV in de relevante diermodellen. Voor RSV zijn verschillende diermodellen beschikbaar. Het kleinst mogelijke model is de katoenrat en dit model kan goed gebruikt worden om de virus replicatie te bestuderen in de longen. Dit model kan beschouwd worden als een eerste keuze model, waarna voor een meer klinisch relevant model gekozen kan worden voor een kandidaat virus voor humaan gebruik. Indien meerdere kandidaat virus stocks beschikbaar zijn kan in het katoenrattenmodel een eerste selectie gemaakt worden op basis van virulentie. Virus stocks die meer virulentie vertonen dan de controle (het oorspronkelijke virus of de meegenomen relevante positieve controle), zullen uitgesloten worden voor humaan gebruik en dus niet verder getest worden in het frettenmodel (NO GO). Kandidaat virus stock(s) die verminderde of gelijke virulentie vertonen in vergelijking met de controle kan (kunnen) vervolgens uitgetest worden in het fretten model (GO). Dit frettenmodel is een meer relevant model, waarbij het ziekteverloop en de uiteindelijke pathologie vergelijkbaar is met de mens. Resultaten verkregen

in het frettenmodel zijn leidend voor de veiligheid in de mens en bij verminderde of gelijke pathologie in vergelijking met de controle kan de betreffende virus stock vrijgegeven worden voor gebruik in de mens (GO). Bij verhoogde pathologie in vergelijking met de controle zal het betreffende virus alsnog gediskwalificeerd worden voor gebruik in de mens (NO GO).

Zoals hierboven genoemd is de primaire uitkomst parameter in deze experimenten afhankelijk van het gekozen diermodel. Deze is voor de verschillende modellen:

- Katoenratten: virus replicatie in de longen (virulentie)
- Fretten: long pathologie (pathogeniciteit)

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.

**Katoenratten:**

Nadat de dieren zijn aangekomen binnen de faciliteit zullen ze een acclimatisatie periode hebben van minimaal 1 week. Dieren worden voor de proef gewogen, geïdentificeerd door middel van oorknip en er wordt bloed afgenomen via de wangprik (~100ul) voor serum (het zogenaamde nul-monster). Deze hoeveelheid serum (~50ul) is voldoende om in het geval van onverwachte resultaten op basis van serologie uit te sluiten dat de dieren op voorhand een immunologische respons hadden die van invloed zou kunnen zijn op de infectie. Daarnaast zal dit nul-monster ook dienen als referentie in de serologische analyses. Nadat de dieren zijn gesedeerd (isofluraan 3-4%), worden de dieren intranasaal (50µL) geïnoculeerd. Op een aantal vroege tijdstippen na inoculatie worden een aantal dieren van iedere groep geëuthanaseerd, waarna de longen worden verzameld. Deze vroege tijdstippen zijn gekozen om tijdens de log-fase van de virus replicatie te bestuderen of er verschillen zijn tussen de verschillende doseringen/virussen op basis van virulentie en pathologie. Het tijdstip van dit vroege moment zal afhangen van het betreffende virus en zal bepaald worden op basis van reeds beschikbare data of via literatuur onderzoek. De overgebleven dieren worden aan het einde van het experiment (dag 14) geëuthanaseerd en ook hier worden de longen verzameld voor virologie en pathologie. Dit late tijdstip is gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. Het eerste (verlengde uitscheiding van het virus) zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus. Tijdens de gehele studie worden de dieren dagelijks gewogen en wordt er gekeken naar klinische verschijnselen. Daarnaast zullen dieren vroegtijdig uit de studie worden gehaald indien het humane eindpunt wordt bereikt. Hieronder is een voorbeeld van een dergelijke studie waarin een bepaald(e) RSV dosis (doses) getest wordt in katoenratten. Daarnaast zal in een dergelijke studie een negatieve en een positieve controle meegenomen worden. De positieve controle dient om de vergelijking te maken met het uit te testen virus en de negatieve controle als nul-referentie ten opzichte van de geïnfecteerde dieren. Voor beide controles zal het tijdstip van euthanasie beschreven en beargumenteerd worden in het werkprotocol.

		Infection phase																			
Group	No/Group	d -7	d -1	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14			
1	6	entry of animals in the preclinical facility	C,W, B	Intranasal Administration of RSV, C, W	C,W	C,W	C, B, W, Euthanasia, T														
2	6						C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T												
3	6						C, W	C, W	C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T										
4	6						C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W
HOUSING		DM-II	DM-II																		

\* W = body weight, B = blood for serum, C = clinical scoring, T = tissue;

**Fretten:**

Nadat de dieren zijn aangekomen binnen de faciliteit zullen ze een acclimatisatie periode hebben van minimaal 1 week. Minimaal 14 dagen voor de start van het experiment zal een zgn. nul-bloedmonster voor referentie in analyses afgenomen worden onder sedatie via de vena jugularis. Dit serum zal gebruikt worden om in het geval van onverwachte resultaten op basis van serologie

uit te sluiten dat de dieren op voorhand een immunologische respons hadden die van invloed zou kunnen zijn op de infectie. Daarnaast zal dit nul-monster ook dienen als referentie in de serologische analyses. Hierna zal een datalogger ingebracht worden. Dit zal gebeuren door middel van een operatie waarbij de buikwand geopend zal worden en de temperatuurlogger via de linea alba in de peritoneale holte geplaatst zal worden waarna de wond gehecht wordt. Deze datalogger meet de lichaamstemperatuur en/of activiteit van het dier gedurende de looptijd van de studie (klinische parameter). Peri- en postoperatief zullen de dieren topicale pijnbestrijding krijgen om het genezingsproces te bevorderen en na afloop van de operatie zal de werking van de anesthesie geantagoneerd worden. Op dag -1 zullen alle dieren gewogen en bemonsterd (neus en keel) worden en op dag 0 via de intranasale route geïnoculeerd worden met een volume van 300ul. Het nul-monster wordt een dag voor de daadwerkelijke inoculatie uitgevoerd om geen interferentie te hebben met de inoculatie zelf. Aangezien hier een uitspraak gedaan zal worden over de veiligheid in gebruik bij de mens, wordt ook de route identiek gehouden (ter vergelijking: een dergelijk challenge in mensen wordt ook via de intranasale route gegeven). Na infectie zal de anesthesie geantagoneerd worden en zullen de dieren dagelijks bemonsterd worden uit de bovenste luchtwegen (keel en neus) onder anesthesie en zal de Body Score Index bepaald worden. Bij makkelijk palpabele ribben zal besloten worden om vanuit welzijnsstandpunt de dieren te wegen tijdens hetzelfde anesthesie moment. Op gezette tijden na infectie (of eerder indien een dier het humane eindpunt bereikt) zullen dieren geëthanaseerd worden voor het verzamelen van relevant weefsel. De overgebleven dieren worden aan het einde van het experiment (dag 14) geëthanaseerd en ook hier worden de longen verzameld. Dit late tijdstip is gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. Het eerste (verlengde uitscheiding van het virus) zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus. Daarnaast zullen de dieren dagelijks tot het einde van de proef geobserveerd worden om te bepalen of er klinische verschijnselen te zien zijn. Hieronder is een voorbeeld van een dergelijke studie waarin twee verschillende (doses van) RSV getest wordt in fretten in vergelijking met een positieve en een negatieve controle. De route van de negatieve dan wel positieve controle kan afwijken van de route voor de uit te testen virus stock (bijvoorbeeld intratracheaal of zowel intratracheaal als intranasaal), dit zal op geleide van historische gegevens gaan en zal beargumenteerd worden in het werkprotocol.

Group	No/Group	Preparation*		Challenge & Sampling**																						
		d -21	d -14**	d -1	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14							
1	3	entry of animals into the preclinical facility	W	Implantation data logger, B*	C, S, W	C, S	C, S	Negative control		C, S	C, S	C, S	C	C, S	C	C	C, S	C	C	C	C, B, S, Euthanasia, T					
2	3							C, S, Euthanasia, T																		
3	3							Virus (dose) 1		C, S	C, S	C, S, Euthanasia, T														
4	3							C, S	C, S	C, S	C	C, B, S, Euthanasia, T														
5	3							C, S	C, S	C, S	C	C, S	C	C	C, S	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C, B, S, Euthanasia, T	
6	3							C, S, Euthanasia, T																		
7	3							Virus (dose) 2		C, S	C, S	C, S, Euthanasia, T														
8	3							C, S	C, S	C, S	C	C, B, S, Euthanasia, T														
9	3							C, S	C, S	C, S	C	C, S	C	C	C, S	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C, B, S, Euthanasia, T	
10	3							Positive control		C, S	C, S	C, S, Euthanasia, T														
HOUSING		DM-I/II		DM-II/isolator																						

Animals seronegative for RSV and Aleutian Disease will be brought into the animal facility  
 \* S = nose & throat swabs, B = blood for serum, C = clinical scoring, W = body weight, T = tissue;  
 \*\* all animals will be implanted with a pre-programmed data logger

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

**Katoenratten:**

Aangezien het hier nieuwe RSV isolaten betreffen welke nog niet uitgetest zijn in het katoenratten model is nog geen spreiding van de resultaten bekend op het gebied van virale load in de longen (primaire uitleesparameter in het katoenrattenmodel). Er kan dus geen exacte statistische

berekening gedaan worden over de groepsgrootte. Als er gekeken wordt naar de publicatie van Overbaugh en Richardson (J. Virology 2005) is gekozen voor een groepsgrootte per euthanasie moment van 6 dieren, bij deze groepsgrootte zal een outlier binnen een groep geen invloed hebben op de significantie. Indien reeds data beschikbaar is van het betreffende wild-type virus, kan dit wel gebruikt worden voor een power berekening en zal dit in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD. Naar analogie met influenza in muizen is wel al beschreven dat met deze aantallen dieren een significante uitspraak gedaan kan worden over de replicatie kinetiek van het opgegroeide virus voor humaan gebruik in vergelijking met het oorspronkelijke virus in muizen (Memoli et al Clinical Infectious Diseases 2015).

#### **Fretten:**

Aangezien het hier nieuwe RSV isolaten betreffen welke nog niet uitgetest zijn in het fretten model is nog geen spreiding van de resultaten bekend op het gebied van de pathologie (primaire uitleesparameter in het frettenmodel). Er kan dus geen exacte statistische berekening gedaan worden over de groepsgrootte. Per euthanasie moment zullen drie dieren gebruikt worden. Aangezien in dit experiment de verschillende groepen met elkaar vergeleken kunnen worden, is het mogelijk om de experimenten met een dergelijk laag aantal dieren per groep uit te voeren. Eerdere vergelijkbare experimenten (dose-finding van influenza virussen in fretten) hebben laten zien dat met dergelijke kleine groepen een goed onderbouwde keuze gemaakt kan worden over de dosis van het betreffende virus. De verwachting is dat in deze experimenten dergelijke aantallen ook voldoende zijn om te komen tot een gedegen uitspraak in de resultaten. Indien reeds data beschikbaar is van het betreffende wild-type virus, kan dit wel gebruikt worden voor een power berekening en zal dit in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD.

#### **B. De dieren**

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

#### **Diersoort:**

- **Katoenratten:** vrouwelijk of mannelijk van 6-8 weken oud.  
Reeds gepubliceerd en eerder door de aanvragen uitgevoerd onderzoek heeft aangetoond dat katoenratten gevoelig zijn voor infectie met RSV. De keus van mannelijke of vrouwelijke dieren zal gemaakt worden op basis van de beschikbaarheid. Gemengde groepen zijn voor dit model niet mogelijk i.v.m. agressie.
- **Fretten:** fretten, mannelijk of vrouwelijk van 4-8 maanden oud.  
Fretten zijn gevoelig voor infectie met wild-type RSV isolaten (eigen uitgevoerd onderzoek). De klinische verschijnselen geobserveerd in fretten zijn overeenkomstig met de klinische verschijnselen in mensen. Voor deze experimenten zullen vrouwelijke of mannelijke dieren gebruikt worden en de keus voor een bepaald geslacht zal bepaald worden door de beschikbaarheid van de verschillende geslachten. De beschikbaarheid van een gevalideerd model is minder van toepassing in deze dierproeven aangezien binnen deze experimenten de verschillende groepen 1:1 vergeleken worden met elkaar. Daarnaast zijn de groepen dusdanig klein in deze experimenten, dat met dergelijke aantallen niet gewerkt kan worden met gemixte groepen van mannelijke en vrouwelijke dieren. Het gebruik van gemixte groepen zal altijd gepaard gaan met grotere aantallen en is niet wenselijk in het kader van vermindering.

#### **Herkomst:** geregistreerde proefdierfokker

- Fretten: Er is een jarenlange relatie met de betreffende fokker en in overleg met de aanvrager is een huisvestingsregime opgesteld dat de influenza-specifieke seronegativiteit van de dieren waarborgt. Dit laatste garandeert dat de dieren ook daadwerkelijk geïnfecteerd kunnen worden.

#### **Geschatte aantal:**

- Katoenratten: 600 dieren in 5 jaar. Er wordt verwacht om een dergelijke studie 2 keer per jaar uit te voeren voor een bepaald virus in twee verschillende doseringen met per dosering vier verschillende euthanasie momenten t.o.v. een positieve en een negatieve controle die beide een enkel euthanasie moment hebben, dus een totaal aantal van 2 studies x 10 groepen van 6 dieren x 5 jaar = 600 dieren
- Fretten: 300 dieren in 5 jaar. Er wordt verwacht om een dergelijke studie 2 keer per jaar

uit te voeren voor een bepaald virus in twee verschillende doseringen met per dosering vier verschillende euthanasie momenten t.o.v. een positieve en een negatieve controle die beide een enkel euthanasie moment hebben, dus een totaal aantal van 2 studies x 10 groepen van 3 dieren x 5 jaar = 300 dieren

Bij de berekening van de aantallen is rekening gehouden met het feit dat elk jaar 2 verschillende RSV virussen circuleren (1xA en 1xB). Effectiviteit dient dus uitgetest te worden tegen allebei de circulerende virussen, vandaar dat een dergelijke studie 2 keer per jaar wordt uitgevoerd.

### 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.

**Vervanging:** deze experimenten zijn opgezet om te bepalen of de virus stock die geproduceerd is voor gebruik in de mens vergelijkbaar of minder pathogeen is dan het oorspronkelijke virus. Eerste resultaten zullen verkregen worden in vitro, waarbij bestudeerd wordt of het virus een andere groei kinetiek vertoont. Bij verhoogde groei kinetiek kan besloten worden om het in vivo experiment niet uit te voeren (GO/NO GO beslissing). Voor het bepalen van de pathogeniciteit en replicatie in de luchtwegen is het intacte dier benodigd en daarom is dit in vitro niet na te bootsen.

**Vermindering:** voorafgaand aan het in vivo experiment, zal het virus in vitro bestudeerd worden om te bepalen of de kinetiek van de virus stock afwijkt van het oorspronkelijke virus. Indien een verhoogde replicatie/pathogeniciteit (in vitro) geobserveerd wordt, kan besloten worden om de betreffende stock niet uit te testen in vivo. Bovengenoemde groepsgrootte is bepaald op basis van verwachtingen, echter indien al in vivo resultaten beschikbaar zijn voor het betreffende virus zal dit gebruikt worden voor een nieuwe power berekening. Deze zal in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD.

**Verfijning:** Meest invasieve behandelingen zullen uitgevoerd worden onder sedatie en dieren worden dagelijks geobserveerd. Indien de klinische symptomen daartoe aanleiding geven (vertonen van ademhalingsproblemen) zullen de dieren frequenter geobserveerd worden. Zo kan voorkomen worden dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment. Als er meerdere kandidaat RSV virussen zijn, zullen deze in eerste instantie het katoenrattenmodel bestudeerd worden. Op basis van de resultaten in deze studies kan besloten worden om bepaalde RSV virussen wel (GO) of niet (NO GO) uit te testen in het frettenmodel. In het algemeen is RSV een laag-pathogeen virus, daarom zal het veroorzaakte ongerief ook beperkt zijn in beide modellen. Echter, tijdens de challenge fase kunnen klinische symptomen zeer snel tot uiting komen omdat de replicatie van RSV een logaritmische curve doormaakt. Zo kan bijvoorbeeld aan het eind van de dag besloten worden om laat op de avond nog een extra controle tijdstip in te voegen vanwege dierwelzijnsstandpunt om te voorkomen dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment.

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

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt



worden door het feit dat de dieren gehuisvest zullen worden na infectie onder klasse II of klasse III inperking. Afval (bedding, kadavers en andere gebruikte materialen) zal aangeboden worden voor destructie.

## 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.

n.v.t.

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

Na de operatieve plaatsing van de temperatuur loggers bij fretten zullen de dieren peri- en post operatief pijnbestrijding krijgen (meloxicam). Als gevolg van de infectie en vervolgens replicatie van het virus in de luchtwegen, is de inschatting dat de dieren geen pijn zullen ondervinden.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Andere verschijnselen die de dieren kunnen vertonen, maar die niet gepaard gaan met pijn zijn:

- zijn algemene verschijnselen: gewichtsverlies en verminderd actief bij stimulatie

- respiratoire verschijnselen: een verhoogde ademhalingsfrequentie (deze zal bij verergering overgaan in stokkende/schokkende ademhaling)

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De klachten worden veroorzaakt door infectie met RSV en vervolgens replicatie in de luchtwegen (respiratoire verschijnselen).

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

Behalve na implantatie van de temperatuur loggers in fretten, is de inschatting is dat de dieren binnen de studie geen pijn zullen ondervinden als gevolg van de infectie (zie ook H). Daarnaast is het zo dat de meest gangbare analgetica in het algemeen naast pijnstillende ook een ontstekingsremmende werking hebben en kunnen dus interfereren in de studie. Daarom is per definitie het gebruik van dergelijke analgetica niet mogelijk in deze experimenten vanwege verstoring van de primaire uitlees parameter.

## 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.

### Katoenratten:

De dieren zullen dagelijks geobserveerd worden en klinische scores worden genoteerd. Bij matig ongerief (zie hieronder de inschaling van de ongerief klassen) zal het betreffende dier uit de studie worden genomen. Deze klinische ongerief klassificaties zijn:

Licht: 2 algemene symptomen\*

Matig: 3 algemene symptomen\*

Ernstig: gewichtsverlies van >15% ten opzichte van gewicht bij aanvang van de proef.

\* algemene symptomen: opgezette vacht, gebogen postuur en verminderd actief

### Fretten:

Tijdens de challenge fase kunnen infectie gerelateerde verschijnselen optreden welke leiden tot de volgende humane eindpunten. Bij het vertonen 1 van de volgende humane eindpunten (matig ongerief) zal het betreffende dier geëuthanaseerd worden:

1. Gewichtsverlies: na infectie worden de dieren dagelijks bemonsterd, waarbij ook de Body Score Index bepaald kan worden. Indien de dieren een voelbare vermagering hebben (ribben makkelijk palpabel), zullen ze vanuit welzijnsstandpunt dagelijks gewogen worden. Het humane eindpunt is gedefinieerd als het betreffende dier >10% gewicht verliest (geclassificeerd als matig ongerief) t.o.v. het startgewicht op de dag van challenge.
2. Respiratie: bij verergering van de ziekte zal de ademhaling veranderen van normale naar een verhoogde ademhalingsfrequentie (licht ongerief). Bij verergering van de symptomen naar stokkende / schokkende ademhaling zal het dier geëuthanaseerd worden (matig ongerief).

### Katoenratten/Fretten:

Bij de volgende verschijnselen zullen de dieren direct geëuthanaseerd worden (geclassificeerd als ernstig ongerief):

1. Lethargie: indien een dier lethargisch is (m.a.w. als het niet meer reageert op externe prikkels).

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

100% van de dieren zullen licht ongerief vertonen als gevolg van de infectie met RSV. De verwachting is dat meer dan licht ongerief niet zal voorkomen (<5%) aangezien in het algemeen RSV alleen milde infectie zal induceren in katoenratten en fretten.

### K. Classificatie van ongerief

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

Het cumulatieve ongerief voor deze experimenten wordt ingeschaald op licht.

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Om te controleren of het virus repliceert in de longen en wat de pathologische schade is in de longen, worden deze verwijderd en verder verwerkt voor onderzoek. Dit is niet mogelijk bij in leven laten van het dier.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	90500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		3	Veiligheid van rhinovirus voor humaan gebruik

*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.

Voor het onderzoek naar rhinovirus is het ook mogelijk om gebruik te maken van gezonde vrijwilligers in plaats van proefdieren. Om de veiligheid van deze vrijwilligers te waarborgen is het van belang dat het virus waarmee ze worden geïnficeerd van te voren worden getest op virulentie en pathogeniciteit. Bij de productie van een virus stock voor gebruik in de mens wordt het betreffende virus in vitro opgegroeid. Om te kunnen garanderen dat het virus dat de mens in gaat nog steeds het zelfde fenotype heeft, zal deze eerst in dieren getest moeten. Dergelijke vereisten zijn in het algemeen omschreven in de Pharmacopeia, vertaald door Memoli et al (Clinical Infectious Diseases 2015, Appendix 1) en toegepast in de genoemde publicatie voor wat betreft het uittesten van influenza virus in muizen. Dergelijke studies voor het uittesten van rhinovirus zijn nog niet eerder beschreven in de literatuur en derhalve zijn de studies zoals beschreven in dierproef 1 als richtlijn gebruikt voor het uittesten van rhinovirus in het relevante diermodel. Voor rhinovirus is vooralsnog maar één diermodel beschikbaar, namelijk de katoenrat. Dit model kan goed gebruikt worden om de virus replicatie te bestuderen in de longen. Virus stocks die meer virulentie vertonen dan de controle (het oorspronkelijke virus of de meegenomen relevante positieve controle), zullen uitgesloten worden voor humaan gebruik (NO GO). Virus stock(s) die verminderde of gelijke virulentie vertonen in vergelijking met de controle kunnen vrijgegeven worden voor gebruik in de mens (GO).

De primaire uitkomst parameter in deze experimenten is: virus replicatie in de longen (virulentie).

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.

#### Katoenratten:

Nadat de dieren zijn aangekomen binnen de faciliteit zullen ze een acclimatisatie periode hebben

van minimaal 1 week. Dieren worden voor de proef gewogen, geïdentificeerd door middel van oorknip en er wordt bloed afgenomen via de wangprik (~100ul) voor serum (het zogenaamde nul-monster). Deze hoeveelheid serum (~50ul) is voldoende om in het geval van onverwachte resultaten op basis van serologie uit te sluiten dat de dieren op voorhand een immunologische respons hadden die van invloed zou kunnen zijn op de infectie. Daarnaast zal dit nul-monster ook dienen als referentie in de serologische analyses. Nadat de dieren zijn gesedeerd (isofluraan 3-4%), worden de dieren intranasaal (50µL) geïnoculeerd. Op een aantal vroege tijdstippen na inoculatie worden een aantal dieren van iedere groep geëuthanaseerd, waarna de longen worden verzameld. Deze vroege tijdstippen zijn gekozen om tijdens de log-fase van de virus replicatie te bestuderen of er verschillen zijn tussen de verschillende doseringen/virussen op basis van virulentie en pathologie. De overgebleven dieren worden aan het einde van het experiment (dag 14) geëuthanaseerd en ook hier worden de longen verzameld voor virologie en pathologie. Dit late tijdstip is gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. Het eerste (verlengde uitscheiding van het virus) zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus. Tijdens de gehele studie worden de dieren dagelijks gewogen en wordt er gekeken naar klinische verschijnselen. Daarnaast zullen dieren vroegtijdig uit de studie worden gehaald indien het humane eindpunt wordt bereikt. Hieronder is een voorbeeld van een dergelijke studie waarin een bepaald(e) rhinovirus dosis (doses) getest wordt in katoenratten. Daarnaast zal in een dergelijke studie een negatieve en een positieve controle meegenomen worden. De positieve controle dient om de vergelijking te maken met het uit te testen virus en de negatieve controle als nul-referentie ten opzichte van de geïnfecteerde dieren. Voor beide controles zal het tijdstip van euthanasie beschreven en beargumenteerd worden in het werkprotocol.

		<i>Infection phase</i>																					
Group	No./Group	d -7																					
			d -1	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14					
1	6	<i>entry of animals in the preclinical facility</i>	C,W, B	Intranasal Administration of RSV, C, W	C,W	C,W												C, B, W, Euthanasia, T					
2	6						C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T														
3	6						C, W	C, W	C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T												
4	6						C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T	
HOUSING		DM-II	DM-II																				

\* W = body weight, B = blood for serum, C = clinical scoring, T = tissue;

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

Aangezien het hier nieuw opgegroeide rhinovirussen betreffen welke nog niet uitgetest zijn in het katoenratten model is nog geen spreiding van de resultaten bekend op het gebied van virale load in de longen (primaire uitleesparameter in het katoenrattenmodel). Er kan dus geen exacte statistische berekening gedaan worden over de groeps grootte. Als er gekeken wordt naar de publicatie van Overbaugh en Richardson (J. Virology 2005) is gekozen voor een groeps grootte per euthanasie moment van 6 dieren, bij deze groeps grootte zal een outlier binnen een groep geen invloed hebben op de significantie. Indien reeds data beschikbaar is van het betreffende wild-type virus, kan dit wel gebruikt worden voor een gedegen power berekening en zal dit in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD. Naar analogie met influenza in muizen is wel al beschreven dat met deze aantallen dieren een significante uitspraak gedaan kan worden over de replicatie kinetiek van het opgegroeide virus voor humaan gebruik in vergelijking met het oorspronkelijke virus in muizen (Memoli et al Clinical Infectious Diseases 2015).

## B. De dieren

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

### Diersoort:

- **Katoenratten:** vrouwelijk of mannelijk van 6-8 weken oud.  
Reeds gepubliceerd onderzoek heeft aangetoond dat katoenratten gevoelig zijn voor infectie met rhinovirus. De keus van mannelijke of vrouwelijke dieren zal gemaakt worden op basis van de beschikbaarheid. Gemengde groepen zijn voor dit model niet mogelijk i.v.m. agressie.

**Herkomst:** geregistreerde proefdierfokker

### Geschatte aantal:

- Katoenratten: 300 dieren in 5 jaar. Er wordt verwacht om een dergelijke studie 1 keer per jaar uit te voeren voor een bepaald virus in twee verschillende doseringen met per dosering vier verschillende euthanasie momenten t.o.v. een positieve en een negatieve controle die beide een enkel euthanasie moment hebben, dus een totaal aantal van 1 studie x 10 groepen van 6 dieren x 5 jaar = 300 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.

**Vervanging:** deze experimenten zijn opgezet om te bepalen of de virus stock die geproduceerd is voor gebruik in de mens vergelijkbaar of minder pathogeen is dan het oorspronkelijke virus. Eerste resultaten zullen verkregen worden in vitro, waarbij bestudeerd wordt of het virus een andere groei kinetiek vertoont. Bij verhoogde groei kinetiek kan besloten worden om het in vivo experiment niet uit te voeren (GO/NO GO beslissing). Voor het bepalen van de replicatie in de luchtwegen is het intacte dier benodigd en daarom is dit in vitro niet na te bootsen.

**Vermindering:** voorafgaand aan het in vivo experiment, zal het virus in vitro bestudeerd worden om te bepalen of de kinetiek van de virus stock afwijkt van het oorspronkelijke virus. Indien een verhoogde replicatie/pathogeniciteit (in vitro) geobserveerd wordt, kan besloten worden om de betreffende stock niet uit te testen in vivo. Bovengenoemde groepsgrootte is bepaald op basis van verwachtingen, echter indien al in vivo resultaten beschikbaar zijn voor het betreffende virus zal dit gebruikt worden voor een nieuwe power berekening. Deze zal in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD.

**Verfijning:** Meest invasieve behandelingen zullen uitgevoerd worden onder sedatie en dieren worden dagelijks geobserveerd. Indien de klinische symptomen daartoe aanleiding geven (vertonen van ademhalingsproblemen) zullen de dieren frequenter geobserveerd worden. Zo kan voorkomen worden dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment. In het algemeen is rhinovirus een laag-pathogeen virus, daarom zal het veroorzaakte ongerief ook beperkt zijn. Echter, tijdens de challenge fase kunnen klinische symptomen zeer snel tot uiting

komen omdat de replicatie van rhinovirus een logaritmische curve doormaakt. Zo kan bijvoorbeeld aan het eind van de dag besloten worden om laat op de avond nog een extra controle tijdstip in te voegen vanwege dierwelzijnsstandpunt om te voorkomen dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment.

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

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt worden door het feit dat de dieren gehuisvest zullen worden na infectie onder klasse II of klasse III inperking. Afval (bedding, kadavers en andere gebruikte materialen) zal aangeboden worden voor destructie.

## 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.

n.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

## I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Andere verschijnselen die de dieren kunnen vertonen, maar die niet gepaard gaan met pijn zijn:

- zijn algemene verschijnselen: gewichtsverlies en verminderd actief bij stimulatie
- respiratoire verschijnselen: een verhoogde ademhalingsfrequentie (deze zal bij verergering overgaan in stokkende/schokkende ademhaling)

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De klachten worden veroorzaakt door infectie met rhinovirus en vervolgens replicatie in de luchtwegen (respiratoire verschijnselen).

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

De inschatting is dat de dieren binnen de studie geen pijn zullen ondervinden als gevolg van de infectie. Daarnaast is het zo dat de meest gangbare analgetica in het algemeen naast pijnstillende ook een ontstekingsremmende werking hebben en kunnen dus interfereren in de studie. Daarom is per definitie het gebruik van dergelijke analgetica niet mogelijk in deze experimenten vanwege verstoring van de primaire uitlees parameter.

## 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.

De dieren zullen dagelijks geobserveerd worden en klinische scores worden genoteerd. Bij matig ongerief (zie hieronder de inschaling van de ongerief klassen) zal het betreffende dier uit de studie worden genomen. Deze klinische ongerief klassificaties zijn:

Licht: 2 algemene symptomen\*

Matig: 3 algemene symptomen\*

Ernstig: gewichtsverlies van >15% ten opzichte van gewicht bij aanvang van de proef

\* algemene symptomen: opgezette vacht, gebogen postuur en verminderd actief

Bij de volgende verschijnselen zullen de dieren direct geëuthanaseerd worden (geclassificeerd als ernstig ongerief):

1. Lethargie: indien een dier lethargisch is (m.a.w. als het niet meer reageert op externe prikkels).

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

100% van de dieren zullen licht ongerief vertonen als gevolg van de infectie met rhinovirus. De verwachting is dat meer dan licht ongerief niet zal voorkomen (<5%) aangezien in het algemeen rhinovirus alleen milde infectie zal induceren in katoenratten.

## K. Classificatie van ongerief

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

Het cumulatieve ongerief voor deze experimenten wordt ingeschaald op licht.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee



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

Om te controleren of het virus repliceert in de longen en wat de pathologische schade is in de longen, worden deze verwijderd en verder verwerkt voor onderzoek. Dit is niet mogelijk bij in leven laten van het dier.

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

██████████

Nistelrooise Baan 3

5347 RE SCHAIJK



**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  
AVD905002016413

**Bijlagen**

2

Datum 30 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ██████████,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 30 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD905002016413. 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](http://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: 90500  
Naam instelling of organisatie: BioXpert BV  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 54838134  
Straat en huisnummer: Nistelrooise Baan 3  
Postcode en plaats: 5347 RE SCHAIJK  
IBAN: NL72RABO0183605888  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: BioXpert BV

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]

**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 mei 2016  
Geplande einddatum: 30 april 2021  
Titel project: Uittesten van veiligheid van respiratoire humane challenge virussen in verschillende proefdier modellen  
Titel niet-technische samenvatting: Testen van de veiligheid van bovenste luchtweg virussen bestemd voor humaan gebruik in muizen, katoenratten en fretten.  
Naam DEC: [REDACTED]  
Postadres DEC: [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.441,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

**Ondertekening**

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Schaijk

Datum:

29 maart 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

Nistelrooise Baan 3

5347 RE SCHAIJK



**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  
AVD905002016413

**Bijlagen**

2

Datum 30 maart 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 30 maart 2016

Vervaldatum: 29 april 2016

Factuurnummer: 16700413

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD905002016413	€ 1.441,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

# 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: AVD905002016413
2. Titel van het project: Uittesten van veiligheid van respiratoire humane challenge virussen in verschillende proefdier modellen.
3. Titel van de NTS: Testen van de veiligheid van bovenste luchtweg virussen bestemd voor humaan gebruik in muizen, katoenratten en fretten.
4. Type aanvraag:
  - X nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: ██████████
  - telefoonnummer contactpersoon: ██████████
  - mailadres contactpersoon: ██████████
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - X ontvangen door DEC: 30-03-2016
  - X aanvraag compleet: 13-04-2016
  - X in vergadering besproken: 13-04-2016 en 18-05-2016
  - anderszins behandeld: kleine commissie 04-04-2016
  - termijnonderbreking(en) van 04-04-2016 / tot 07-04-2016
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - X aanpassing aanvraag: 07-04-2016 en 03-05-2016
  - X advies aan CCD: 20-05-2016
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
8. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum: 04-04-2016 (pre-screening) en 28-04-2016 (finale bijstelling)
  - Strekking van de vragen:
    - o De aangegeven doelcategorieën lijken niet geheel in overeenstemming met de inhoud.



- U zou de aanvraag kunnen versterken door beter aan te geven waarom de drie testtrajecten samen een toetsbare eenheid vormen.
  - Aantallen dieren en aantallen malen dat de verschillende modellen zullen worden ingezet behoeven nadere onderbouwing.
  - U hebt verzuimd om de haalbaarheid van de doelstelling te onderbouwen.
  - Belang van de doelstelling: dit onderzoek richt zich in de eerste plaats op het waarborgen van de veiligheid van de proefpersonen.
  - In welke zin er sprake is van kwantitatieve bepalingen?
  - Wanneer en hoe zal worden besloten een virus te testen in deze modellen? Beschikt de aanvrager steeds over alle noodzakelijke informatie van de opdrachtgever om hierover zelf een wetenschappelijk verantwoord besluit te kunnen nemen?
  - Implanteren van een datalogger behoeft rechtvaardiging.
  - Bij de fretten kan klaarblijkelijk worden volstaan met drie dieren per groep. Waarom zijn er dan toch 6 muizen/katoenratten per groep nodig?
  - Het verdient aanbeveling de keuze van het geslacht van de dieren steeds te vermelden en zo goed mogelijk te onderbouwen.
  - Punt E behoeft nadere uitwerking i.v.m. wettelijk vereist onderzoek.
  - Discrepantie tussen de ernst van de humane eindpunten (J) en de inschatting van het cumulatieve ongerief bij K.
  - Ongeriefcategorie van de fretten dient naar het oordeel van de DEC te worden ingeschat als matig.
  - Redactionele aspecten: Nader verduidelijking en toespitsing van diverse tekstpassages in de NTS.
- Datum antwoord: 07-04-2016 en 03-05-2016
  - Strekking van het de antwoorden: De vragen en opmerkingen van de DEC zijn naar tevredenheid beantwoord; aanvraag na bijstelling volledig en duidelijk.
  - De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t., de DEC beschikt zelf over de relevante expertise.

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

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

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

1. Het project is:
  - X uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
  - X wettelijk vereist
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Bovenste luchtweginfecties door virussen (influenza, RSV en rhinovirus) zorgen jaarlijks voor een hoge ziektelast. Dit leidt tot een hoge economische schade. Daarnaast kunnen bij de zogenaamde risicogroepen (baby's, jonge kinderen, bejaarden, chronisch zieken en patiënten met een verzwakt afweersysteem) ernstige complicaties en zelfs sterfte optreden. Vanwege het feit dat deze bovenste luchtweginfecties een hoge ziektelast en een hoge economische schade veroorzaken, zoeken farmaceutische bedrijven naar vaccins en medicijnen om de ziektelast en economische schade te verlagen. Tevens kunnen deze vaccins en medicijnen ingezet worden bij ernstigere ziektebeelden in risico groepen. Tot voor kort werden dergelijke vaccins en medicijnen alleen uitgetest in proefdieren, maar in de afgelopen jaren is voor relatief milde luchtweg infecties door virussen ook de mens als studie object in opkomst. Het grote voordeel hiervan is de controleerbaarheid van de studie. In tegenstelling tot bij een groot opgezette klinische veldstudie, kunnen bij een humane challenge in een vaccin- of medicijntest de deelnemers uitvoerig gescreend worden en is van alle deelnemers bekend of ze geïnfecteerd zijn en dus of het middel gewerkt heeft. Vanuit de

regelgevende instanties wordt geëist dat dergelijke virussen die gebruikt zullen worden in de mens, worden getest op veiligheid. Met name dient te worden aangetoond dat ze na het kweken niet virulenter zijn geworden dan het oorspronkelijke virus. De experimenten omschreven in deze aanvraag hebben tot doel om te testen of de challenge virussen veilig zijn (mild genoeg zijn) voor gebruik in de mens.

De commissie schat het belang van het project in als een **substantieel** belang, niet alleen omdat het van belang is de veiligheid van de humane proefpersonen te garanderen, maar ook omdat het van belang is dat de vaccins en medicijnen in een zo relevant mogelijk model worden getest. Deze experimenten in dieren dragen er aan bij dat dit mogelijk wordt.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De instelling heeft een uitgebreide ervaring met het uitvoeren van dit soort testen (in opdracht van derden) en beschikt over gespecialiseerde kennis van de gebruikte diermodellen en van de respiratoire infecties die in deze diermodellen kunnen optreden.
5. Er is in wettelijk opzicht geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De diersoorten die worden gebruikt, muizen, katoenratten en fretten zijn gebruikelijk voor dit type onderzoek naar respiratoire virussen. De keuzes met betrekking tot deze zaken zijn voldoende wetenschappelijk onderbouwd.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Naar verwachting zullen alle dieren (muizen, katoenratten en fretten) na toediening van de viruspreparaten niet meer dan licht ongerief vertonen aangezien het de bedoeling is dat de virussen slechts milde verschijnselen veroorzaken. Bij alle fretten komt het cumulatieve ongerief uit op matig, omdat deze dieren in het kader van de studies een aantal handelingen onder anesthesie ondergaan, zoals het chirurgische implanteren van een temperatuurlogger, inoculatie en dagelijkse bemonstering. In een studie die bedoeld is om de veiligheid van een viruspreparaat te testen, kan bij hoge uitzondering blijken dat een bepaald preparaat niet veilig is en toch

ernstige klinische symptomen veroorzaakt. Waar nodig zal daarom de observatie frequentie worden verhoogd en zullen strikte humane eindpunten worden toegepast. De commissie kiest er desondanks bewust voor om het ongerief niet voor een klein percentage van de dieren als ernstig te classificeren, aangezien zij de kans daarop vrijwel nihil acht.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. Vooraf kan in vitro getest worden of de virussen waar het om gaat voldoende infectieus zijn, en dit gebeurt ook. Aantonen dat de gekweekte virus stocks niet virulenter zijn en geen ernstiger verschijnselen veroorzaken dan de oorspronkelijke virussen, kan echter alleen in daarvoor diermodellen met een functionerend immuunsysteem die daarvoor geschikt zijn gebleken in eerder onderzoek.

Met betrekking tot vervanging dient verder opgemerkt te worden dat de experimenten in dit project het implementeren van een vervangingsalternatief mogelijk maken. De werkzaamheidstesten van vaccins en medicijnen in mensen zijn een vervanging voor dierproeven.

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De aanvrager voert de studies als zogenaamde CRO uit voor derden. Het aantal dieren is gebaseerd op het verwachte aantal verzoeken voor het uitvoeren van testen en op een realistisch aantal varianten/stammen van de virussen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Alle handelingen die daarvoor in aanmerking komen worden uitgevoerd onder anesthesie en er wordt adequate pijnbestrijding toegepast. Indien van toepassing zullen kandidaat virussen (indien meerdere beschikbaar zijn) in een diermodel uitgetest worden waarin geen of zeer milde klinische verschijnselen verwacht worden (muis, katoenrat). Een geschikt virus zal vervolgens in een meer klinisch relevant diermodel getest worden op veiligheid, waarbij wel klinische verschijnselen verwacht kunnen worden en door uitgebreide bemonstering en observatie meer ongerief optreedt (fret). Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

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

## **D. Ethische afweging**

Op basis van de overwegingen onder bovenstaand punt C (1 t/m 9) komt de commissie tot de volgende ethische afweging.

Bovenste luchtweginfecties door virussen (influenza, RSV en rhinovirus) zorgen voor grote economische schade. Daarnaast kunnen bij de zogenaamde risicogroepen (baby's, jonge kinderen, bejaarden, chronisch zieken en patiënten met een verzwakt afweersysteem) ernstige complicaties en zelfs sterfte optreden. Farmaceutische bedrijven zijn daarom op zoek naar vaccins en medicijnen om de ziektelast en economische schade te verlagen. Tot voor kort werden dergelijke vaccins en medicijnen alleen uitgetest in proefdieren, maar in de afgelopen jaren is voor relatief milde luchtweginfecties door virussen ook de mens als proefpersoon in opkomst. In tegenstelling tot bij een groot opgezette klinische veldstudie, kunnen bij een humane challenge in een vaccin- of medicijntest de deelnemers uitvoerig gescreend worden en is van alle deelnemers bekend of ze geïnfecteerd zijn en dus of het middel gewerkt heeft. Vanuit de regelgevende instanties wordt geëist dat dergelijke virussen die gebruikt zullen worden in de mens, worden getest op veiligheid. Met name dient te worden aangetoond dat ze na het kweken niet virulenter zijn geworden dan het oorspronkelijke virus. De experimenten omschreven in deze aanvraag hebben tot doel om te testen of de challenge virussen veilig zijn (mild genoeg zijn) voor gebruik in de mens.

De commissie schat het belang van het project in als een **substantieel** belang, niet alleen omdat het van belang is de veiligheid van de humane proefpersonen te garanderen, maar ook omdat het van belang is dat de vaccins en medicijnen in een zo relevant mogelijk model worden getest. Deze experimenten in dieren dragen er aan bij dat het mogelijk wordt de effectiviteit van de interventies direct in mensen te testen.

Tegenover dit substantiële belang staat het feit dat alle muizen en katoenratten in de experimenten een lichte welzijnsaantasting zullen ondervinden. De welzijnsaantasting van alle fretten zal matig zijn.

De commissie is ervan overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling is

gegeven 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 naar het oordeel van de commissie onvermijdelijk, wil men de doelstellingen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hierboven geschetste substantiële belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren 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

X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

### 2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



## Format

### Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

In het kader van de ontwikkeling van interventie strategieën tegen respiratoire virussen (in het bijzonder influenza, respiratoir syncytieel virus en rhinovirus) biedt de aanvrager van dit projectvoorstel verschillende preklinische modellen aan om de veiligheid van deze interventie strategieën uit te testen. Daarnaast kunnen deze modellen ook gebruikt worden om virus stocks van bovengenoemde virussen uit te testen op hun veiligheid voor humaan gebruik (zogenaamde humane challenge modellen). Deze preklinische modellen zijn door de aanvrager opgezet of voor de aanvrager beschikbaar en kunnen gebruikt worden om virus stocks verschaft door derden (in het algemeen farmaceutische bedrijven), maar ook in huis geproduceerd uit te testen.

Bovengenoemde virussen zorgen jaarlijks voor een grote ziektelast ondanks het feit dat er bijvoorbeeld een actief jaarlijks vaccinatie beleid is tegen seizoens influenza. Tot een aantal jaar geleden werden interventie strategieën alleen uitgetest in preklinische modellen, echter in de afgelopen jaren is zeker voor relatief milde respiratoire virus infecties ook het humane challenge model in opkomst. Het grote voordeel van dit model is de controleerbaarheid van de studie. Dit in tegenstelling tot een grote klinische studie waarbij het moeilijk is om te voorspellen bij welk aantal deelnemers significantie bereikt wordt in de test resultaten tussen specifiek behandelde en placebo behandelde deelnemers. Daarbij is het soms onduidelijk of de betreffende deelnemer een infectie heeft opgelopen omdat een actief virologisch screeningsbeleid op alle deelnemers logistiek moeilijk is. Bij een humane challenge waarbij een interventie strategie uitgetest wordt, kunnen de deelnemers uitvoerig gescreend worden en is van alle deelnemers bekend of ze geïnfecteerd zijn en dus of de interventie strategie gewerkt heeft.

De virussen die tot nu toe hiervoor in aanmerking komen zijn:

- Milde humane influenza virussen (zogenaamde seizoens influenza virussen)
- Humaan respiratoir syncytieel virus
- Humaan rhinovirus

Van deze bovenstaande virussen moeten voor de humane challenge speciale virusstocks opgegroeid worden in geschikte en goedgekeurde cellijnen. Het is echter niet gegarandeerd dat het relatief milde karakter voor opgroeien in vitro nog van toepassing is na het maken van de humane challenge stock. Alhoewel de mutatie frequentie van deze RNA virussen in het algemeen relatief hoog is zeker onder druk van het immuunsysteem, is dit minder van toepassing voor in vitro opgroeien van virus. Desondanks dienen dergelijk opgegroeide virusstocks uitgetest te worden op hun veiligheid al dan niet in vergelijking met het oorspronkelijke donor virus. Deze laatste keuze zal voornamelijk bepaald worden op beschikbaarheid van dit oorspronkelijke virus. Indien dit een primair isolaat is van een patiënt zal meestal niet voldoende materiaal aanwezig zijn of is de titer van het materiaal niet hoog genoeg om het ook in een dierstudie te gebruiken. Betreft het reeds een bestaande virus stock, dan zou het kunnen zijn dat het oorspronkelijke virus wel degelijk meegenomen kan worden. Indien het oorspronkelijke virus niet beschikbaar is, zal een vergelijkbaar virus (positieve controle) meegenomen worden ter controle.

De lage pathogeniciteit van de opgegroeide challenge stock voor humaan gebruik dient bevestigd te worden in één of meerdere diermodellen, waarbij het kleinste diermodel gekozen wordt dat het meest representatief is voor de gekozen primaire uitleesparameter. In het algemeen staat omschreven in de Pharmacopeia waaraan degelijk biologische reagentia voor humaan gebruik moeten voldoen, maar voor deze specifieke vraagstelling bestaan geen vereisten. Als richtlijn zullen opgegroeide virus stocks voor humane challenge niet pathogener mogen zijn of niet leiden tot hogere viral load dan het oorspronkelijke virus of de positieve controle. Op basis van de resultaten verkregen in de verschillende dierexperimenten, die beschreven zijn in deze aanvraag, kan een uitspraak gedaan worden over de veiligheid van de hier uit te testen virus stocks. In het geval van een humane influenza virus stock bestaat een wetenschappelijke publicatie van Memoli et al. (Clinical Infectious Diseases 2015, Appendix 1) waarin omschreven staat hoe de auteurs het betreffende virus hebben uitgetest. Voor de andere twee bovengenoemde virussen bestaat niet zo'n richtlijn/publicatie, echter gepubliceerd werk en eigen onderzoek heeft wel de gevoeligheid van de voorgedragen diermodellen voor deze virussen bevestigd.

De experimenten zoals hier beschreven bevinden zich in de preklinische fase van het uittesten van de virus stocks voor humaan gebruik. Voorafgaand aan de preklinische studie zal als eerste gecontroleerd



worden door ofwel de opdrachtgever (derden) of door de aanvrager of de virus stocks voldoende infectieus zijn (zoals omschreven bij vervanging in de afzonderlijke bijlagen) in in vitro test systemen. Zodra de virus stock(s) bewezen infectieus is(zijn) kan aangevangen worden met de preklinische studie, die als doel heeft om aan te tonen dat de gegenereerde virus stock voor humaan gebruik veilig is volgens de primaire uitleesparameter die omschreven is in de afzonderlijke bijlagen. Deze preklinische studies hebben een kwantitatief karakter, resultaten verkregen binnen de experimenten met verschillende doses van het virus of tussen het oorspronkelijke virus (al dan niet uit historische resultaten) en het opgegroeide virus zullen direct met elkaar vergeleken worden. De voorwaarde voor alle experimenten ongeacht de primaire uitleesparameter zal zijn dat de virus stock voor humane challenge geen significant hogere bevindingen wat betreft virulentie of pathogeniciteit mag hebben dan het oorspronkelijke virus of de meegenomen positieve controle. Deze bevindingen zijn afhankelijk van het virus en het gekozen diermodel.

### 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?

De algemene doelstelling van het project is het uittesten van de veiligheid van humane respiratoire virussen voor humane challenge door middel van een kwantitatieve bepaling. Uitgangspositie hierin is het oorspronkelijke virus, waarbij de virus stock die bestemd is voor humaan gebruik vergelijkbaar of minder virulent danwel pathogeen (afhankelijk van de primaire uitleesparameter) mag zijn. De primaire uitleesparameter zal afhangen van de combinatie van preklinisch model en virus. Per combinatie van preklinisch model en virus is de primaire uitleesparameter beschreven in de verschillende bijlagen bij dit projectvoorstel. Voor de kleine diermodellen (muizen en katoenratten) zal de primaire uitleesparameter de virologie zijn, namelijk viral load in de longen na infectie. Voor de fretten zal de primaire uitleesparameter pathologie zijn in de longen.

Dit soort studies worden door de aanvrager uitgevoerd om te kunnen voldoen aan de vraag van derden om de veiligheid van humane respiratoire virussen voor humaan gebruik uit te testen en om advies uit te brengen richting regelgevende instanties (WHO en EMA). Vanwege de grote expertise van de aanvrager op het gebied van humane respiratoire virussen en haar relevante preklinische modellen kunnen de resultaten verkregen in deze studies direct gerapporteerd worden aan de regelgevende instanties en vrijgifte van deze virussen voor humaan gebruik. Vanwege de hoge kwaliteit van de studies kunnen deze ook leiden tot publicatie in peer-reviewed tijdschriften en leiden tot veiligheidsrichtlijnen welke op dit moment nog niet duidelijk omschreven zijn voor deze virussen. Uiteindelijk zullen de humane challenge virussen ingezet worden om interventie strategieën uit te testen in de mens en resultaten uit dergelijke studies kunnen leiden tot vrijgifte voor deze interventie strategieën.

### 3.3 Belang

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

De dierproeven beschreven in dit project voorstel zullen gebruikt worden om de veiligheid van humane respiratoire virussen voor gebruik in de mens te bestuderen en te rapporteren aan de regelgevende instanties. Bij bewezen veiligheid kunnen deze humane respiratoire virussen ingezet worden voor het uittesten van interventie strategieën in de mens. Indien in de mens aangetoond kan worden dat de uit te testen interventie strategie effectief is, zullen de verkregen resultaten gebruikt worden in het registratie proces van die betreffende interventie strategie.

Virale bovenste luchtweginfecties zorgen jaarlijks voor een hoge ziektelast en deze zorgen voor een hoge economische schade. Als voorbeeld: voor alleen de Verenigde Staten, een samenleving vergelijkbaar met West-Europa, is uitgerekend dat de economische schade voor niet-influenza bovenste luchtweg infecties

op kan lopen tot 40 miljard dollar (Fendrick Archiv Intern Med 2003). Hierin zijn (al dan niet effectieve en relevante) directe medische kosten meegenomen, maar ook indirecte kosten, zoals bijvoorbeeld het opnemen van vrije dagen door ouders met kinderen die een infectie doormaken. Daarbovenop kunnen bij de zogenaamde risicogroepen (baby's, jonge kinderen, bejaarden, chronisch zieken en patiënten met een verzwakt afweersysteem) ernstige complicatie optreden en zelfs sterfte voorkomen.

Vanwege het feit dat deze bovenste luchtweginfecties een hoge ziektelast en een hoge economische schade veroorzaken, zoeken farmaceutische bedrijven naar interventie strategieën om deze te verlagen. Tevens kunnen deze interventie strategieën ook ingezet worden bij ernstigere ziektebeelden in risico groepen.

Hoewel het uittesten in preklinische modellen een belangrijke stap is in de vrijgave van dergelijke interventie strategieën, wordt steeds vaker het humane challenge model gebruikt in dergelijk onderzoek. Hierbij speelt ook mee dat deze relatief milde infecties ook een beperkt ziektebeeld vertonen in de verschillende preklinische modellen, waardoor het soms lastig is om een behandelingseffect aan te tonen in deze niet natuurlijke gastheren.

---

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het doel van deze projectaanvraag is het uitvoeren van vereiste veiligheidstesten in preklinische studies van humane respiratoire virussen welke uiteindelijk in het humane challenge model gebruikt kunnen worden bij bewezen veiligheid.

Voor de verschillende virussen aangehaald in deze aanvraag zijn één of twee preklinische modellen beschikbaar. Indien twee preklinische modellen beschikbaar zijn, zal een keuze gemaakt worden tussen de twee. In het geval van twee modellen, is het kleinste model (muis voor influenza en katoenrat voor RSV) een minder klinisch relevant model. Indien meerdere kandidaat virus stocks beschikbaar zijn kan in het kleinste model een eerste selectie gemaakt worden, waarna voor een meer klinisch relevant model gekozen kan worden voor een kandidaat virus voor humaan gebruik. In alle experimenten zal op een kwantitatieve manier beoordeeld worden of de virus stock voor humaan gebruik veilig is. Hiertoe zal de voor die betreffende combinatie van virus en diermodel een primaire uitleesparameter gekozen worden (virologie of pathologie, zie voor de primaire uitleesparameter de afzonderlijke bijlagen), welke gelijkwaardig of verminderd pathogeen moet zijn dan het oorspronkelijke virus of de meegenomen positieve controle. In het algemeen geldt dat voor de kleine modellen (muis en katoenrat) de primaire uitleesparameter virus replicatie in de longen is en voor het grote model (fret) pathogeniciteit.

#### 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 alle hier voorgelegde dierproeven zal bepaald worden of een nieuw opgegroeide virus stock vergelijkbaar of verminderd pathogeen is dan het oorspronkelijke virus. Deze bepaling zal op een kwantitatieve manier uitgevoerd worden en per dierproef (combinatie van diermodel en virus) zal bepaald worden wat de primaire uitleesparameter is. Indien van toepassing kan het zijn dat een positieve controle (oorspronkelijke virus of vergelijkbaar relevant virus) en/of een negatieve controle meegenomen wordt. Een dergelijke negatieve controle is om aan te tonen dat bij gelijke (be)handelingen geen effect wordt waargenomen, die toegeschreven kan worden aan de behandeling. Hierbij kan gedacht worden aan meer conventionele modellen, zoals de fret, waarbij bijvoorbeeld minimale macroscopische schade aan de longen inherent is aan het model en niet te wijten is aan de infectie met het virus. Indien mogelijk zullen resultaten van de positieve controle verkregen worden uit reeds uitgevoerde experimenten met het betreffende virus om tegemoet te komen aan vermindering van proefdiergebruik. Op basis van primaire uitleesparameter zijn er twee hoofdlijnen van de verschillende onderdelen:

##### **Virulentie:**

Dieren zullen geïnfecteerd worden met het betreffende virus en al dan niet met een positieve en een negatieve controle. Op verschillende tijdstippen (vroeg en laat) na infectie zal een aantal dieren geëuthanaseerd worden om onder andere de virale load te bepalen in de luchtwegen. De vroege

tijdstippen zijn gekozen om tijdens de log-fase van de virus replicatie te bestuderen of er verschillen zijn tussen de verschillende doseringen/virussen op basis van virulentie. Het late tijdstip is gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. Het eerste (verlengde uitscheiding van het virus) zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus.

**Pathogeniciteit:**

Dieren zullen geïnfecteerd worden met het betreffende virus en al dan niet met een positieve en een negatieve controle. Op verschillende tijdstippen (vroeg en laat) na infectie zal een aantal dieren geëuthanaseerd worden om onder andere de pathogeniciteit te bepalen in de luchtwegen. De vroege tijdstippen zijn gekozen om tijdens de log-fase van de virus replicatie dit te bestuderen tussen de verschillende doseringen/virussen. Het late tijdstip is naast de beoordeling middels pathologie gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. De verlengde uitscheiding van het virus zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus.

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

De verschillende onderdelen dienen allemaal hetzelfde doel, namelijk onderzoek naar de veiligheid van verschillende humane respiratoire virussen voor gebruik in mensen. Afhankelijk van de primaire uitleesparameter zal een keuze gemaakt worden tussen de verschillende modellen zoals beschreven in de verschillende modules, indien meerdere modellen beschikbaar zijn. Daarnaast is het wel zo dat als in het gekozen model verhoogde virulentie of pathogeniciteit geobserveerd wordt, het betreffende virus gediskwalificeerd wordt voor humaan gebruik. In het geval er meer dan één diermodel beschikbaar is, zal het kleinste diermodel bij meerdere kandidaat virussen ingezet worden voor een eerste screening van de beschikbare virussen. Een virus dat voldoet aan het veiligheidsprofiel in dit model zal vervolgens in een meer klinisch relevant (en groter) model uitgetest worden (GO). Een virus dat niet voldoet aan het veiligheidsprofiel zal gediskwalificeerd worden voor gebruik in de mens (NO GO). Dit laatste kan zowel in het kleine diermodel op basis van virulentie als in het grote model op basis van pathogeniciteit besloten worden.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Veiligheid van influenza virus voor humaan gebruik
2	Veiligheid van respiratoir syncytieel virus voor humaan gebruik
3	Veiligheid van rhinovirus voor humaan gebruik
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	90500	
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert	
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	1	Veiligheid van influenza virus voor humaan gebruik

*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.

Voor het onderzoek naar influenza virussen is het ook mogelijk om gebruik te maken van gezonde vrijwilligers in plaats van proefdieren. Om de veiligheid van deze vrijwilligers te waarborgen is het van belang dat de virussen waarmee ze worden geïnfecteerd van te voren worden getest op virulentie en pathogeniciteit. Bij de productie van een virus stock voor gebruik in de mens wordt het betreffende virus in vitro opgegroeid. Om te kunnen garanderen dat het virus dat de mens in gaat nog steeds hetzelfde fenotype heeft, zal deze eerst in dieren getest moeten worden. Dergelijke vereisten zijn in het algemeen omschreven in de Pharmacopeia, vertaald door Memoli et al (Clinical Infectious Diseases 2015, Appendix 1) en toegepast in de genoemde publicatie voor wat betreft het uittesten van influenza virus in muizen. Voor influenza zijn verschillende diermodellen beschikbaar, die al dan niet translationeel zijn naar de mens. Het kleinst mogelijke model is de muis en alhoewel het klinische beeld niet overeenkomt met dat van de mens en muizen verminderd vatbaar zijn voor niet muis-geadapteerde influenza stammen, kan dit model wel gebruikt worden om de virus replicatie te bestuderen in de longen. Dit model kan beschouwd worden als een eerste keuze model, waarna voor een meer klinisch relevant model gekozen kan worden voor een kandidaat virus voor humaan gebruik. Indien meerdere kandidaat virus stocks beschikbaar zijn kan in het muizenmodel een eerste selectie gemaakt worden op basis van virulentie. Virus stocks die meer virulentie vertonen dan de controle (het oorspronkelijke virus of de meegenomen relevante positieve controle), zullen uitgesloten worden voor humaan gebruik en dus niet verder getest worden in het frettenmodel (NO GO). Kandidaat virus stock(s) die verminderde of gelijke virulentie vertonen in vergelijking met de controle kan (kunnen ) vervolgens uitgetest worden in het fretten model (GO). Dit frettenmodel is een meer relevant model, waarbij de aanhechting van het virus, het ziekteverloop en de uiteindelijke pathologie vergelijkbaar is met de mens. Resultaten verkregen in het frettenmodel zijn leidend voor de veiligheid in de mens en bij verminderde of gelijke pathologie in vergelijking met de controle kan de betreffende virus stock vrijgegeven worden voor gebruik in de mens (GO). Bij verhoogde pathologie in vergelijking met de controle zal het

betreffende virus alsnog gediskwalificeerd worden voor gebruik in de mens (NO GO).

Zoals hierboven genoemd is de primaire uitkomst parameter in deze experimenten afhankelijk van het gekozen diermodel. Deze is voor de verschillende modellen:

- Muizen: virus replicatie in de longen (virulentie)

Fretten: long pathologie (pathogeniciteit)

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.

**Muizen:**

Nadat de dieren zijn aangekomen binnen de faciliteit zullen ze een acclimatisatie periode hebben van minimaal 1 week. Dieren worden voor de proef gewogen, geïdentificeerd door middel van oorknip en er wordt bloed afgenomen via de wangprik (~100ul) voor serum (het zogenaamde nul-monster). Deze hoeveelheid serum (~50ul) is voldoende om in het geval van onverwachte resultaten op basis van serologie uit te sluiten dat de dieren op voorhand een immunologische respons hadden die van invloed zou kunnen zijn op de infectie. Daarnaast zal dit nul-monster ook dienen als referentie in de serologische analyses. Nadat de dieren zijn gesedeerd (isofluraan 3-4%), worden de dieren intranasaal (50µL) geïnoculeerd. Op een aantal vroege tijdstippen na inoculatie wordt een aantal dieren van iedere groep geëuthanaseerd, waarna de longen worden verzameld. Deze vroege tijdstippen zijn gekozen om tijdens de log-fase van de virus replicatie te bestuderen of er verschillen zijn tussen de verschillende doseringen/virussen op basis van virulentie en pathologie. Het tijdstip van deze vroege momenten zal afhangen van het betreffende virus en zal bepaald worden op basis van reeds beschikbare data of via literatuur onderzoek. De overgebleven dieren worden aan het einde van het experiment (dag 14) geëuthanaseerd en ook hier worden de longen verzameld voor virologie en pathologie. Dit late tijdstip is gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. Het eerste (verlengde uitscheiding van het virus) zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus. Tijdens de gehele studie worden de dieren dagelijks gewogen en wordt er gekeken naar klinische verschijnselen. Daarnaast zullen dieren vroegtijdig uit de studie worden gehaald indien het humane eindpunt wordt bereikt. Hieronder is een voorbeeld van een dergelijke studie waarin een bepaald(e) influenza virus (dosis) getest wordt in muizen. Daarnaast zal in een dergelijke studie een negatieve en een positieve controle meegenomen worden. De positieve controle dient om de vergelijking te maken met het uit te testen virus en de negatieve controle als nul-referentie ten opzichte van de geïnfecteerde dieren. Voor beide controles zal het tijdstip van euthanasie beschreven en beargumenteerd worden in het werkprotocol.

Group		No/Group	Infection phase																		
		d -7																			
			d -1	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14			
1	6	entry of animals in the preclinical facility	C,W, B	Intranasal Administration of influenza virus, C, W	C,W	C,W	C, B, W, Euthanasia, T														
2	6						C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T												
3	6						C, W	C, W	C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T										
4	6						C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T
HOUSING		DM-II	DM-II																		

\* W = body weight, B = blood for serum, C = clinical scoring, T = tissue;

**Fretten:**

Nadat de dieren zijn aangekomen binnen de faciliteit zullen ze een acclimatisatie periode hebben van minimaal 1 week. Minimaal 14 dagen voor de start van het experiment zal een zgn. nul-bloedmonster voor referentie in analyses afgenomen worden onder sedatie via de vena jugularis. Dit serum zal gebruikt worden om in het geval van onverwachte resultaten op basis van serologie uit te sluiten dat de dieren op voorhand een immunologische respons hadden die van invloed zou kunnen zijn op de infectie. Daarnaast zal dit nul-monster ook dienen als referentie in de serologische analyses. Hierna zal een datalogger ingebracht worden. Dit zal gebeuren door middel van een operatie waarbij de buikwand geopend zal worden en de temperatuurlogger via de linea alba in de peritoneale holte geplaatst zal worden waarna de wond gehecht

wordt. Deze datalogger meet de lichaamstemperatuur en/of activiteit van het dier gedurende de looptijd van de studie (klinische parameter). Peri- en postoperatief zullen de dieren topicale pijnbestrijding krijgen om het genezingsproces te bevorderen en na afloop van de operatie zal de werking van de anesthesie geantagoneerd worden. Deze dataloggers worden gebruikt aangezien fretten (zeker bij milde infecties) klinisch niet duidelijk te scoren zijn ondanks het feit dat in de pathologie (zowel gross als microscopisch) wel degelijk veranderingen te zien zijn. De aldus verkregen data (temperatuur en/of activiteit) dragen bij het analyseren van het model, primaire en secundaire uitleesparameters. Op dag -1 zullen alle dieren gewogen en bemonsterd (neus en keel) worden en op dag 0 via de intranasale route geïnoculeerd worden met een volume van 300ul. Het nul-monster wordt een dag voor de daadwerkelijke inoculatie uitgevoerd om geen interferentie te hebben met de inoculatie zelf. Aangezien hier een uitspraak gedaan zal worden over de veiligheid in gebruik bij de mens, wordt ook de route identiek gehouden (ter vergelijking: een dergelijk challenge in mensen wordt ook via de intranasale route gegeven). Na infectie zal de anesthesie geantagoneerd worden en zullen de dieren dagelijks bemonsterd worden uit de bovenste luchtwegen (keel en neus) onder anesthesie en zal de Body Score Index bepaald worden. Bij makkelijk palpabele ribben zal besloten worden om vanuit welzijnsstandpunt de dieren te wegen tijdens hetzelfde anesthesie moment. Op gezette tijden na infectie (of eerder indien een dier het humane eindpunt bereikt) zullen dieren geëuthanaseerd worden voor het verzamelen van relevant weefsel. De overgebleven dieren worden aan het einde van het experiment (dag 14) geëuthanaseerd en ook hier worden de longen verzameld. Dit late tijdstip is gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. Het eerste (verlengde uitscheiding van het virus) zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus. Daarnaast zullen de dieren dagelijks tot het einde van de proef geobserveerd worden om te bepalen of er klinische verschijnselen te zien zijn. Hieronder is een voorbeeld van een dergelijke studie waarin twee (verschillende doses van een) influenza virus getest worden in fretten in vergelijking met negatieve en een positieve controle. De route van de negatieve danwel positieve controle kan afwijken van de route voor de uit te testen virus stock (bijvoorbeeld intratracheaal of zowel intratracheaal als intrasasaal), dit zal op geleide van historische gegevens gaan en zal beargumenteerd worden in het werkprotocol.

		Preparation*		Challenge & Sampling**																																				
Group	No/Group	d -21	d -14**	d -1	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14																					
1	3	entry of animals into the preclinical facility	Implantation data logger, B*	C, S, W	C, S	C, S	C, S	C, S	C, S	C, S	C	C, S	C	C	C, S	C	C	C	C	C, B, S, Euthanasia, T																				
2	3																				Negative control	C, S, Euthanasia, T																		
3	3																				Virus (dose) 1	C, S, Euthanasia, T	C, S, Euthanasia, T																	
4	3																					C, S, Euthanasia, T	C, S, Euthanasia, T																	
5	3																					C, S, Euthanasia, T	C, S, Euthanasia, T																	
6	3																					C, S, Euthanasia, T	C, S, Euthanasia, T																	
7	3																					C, S, Euthanasia, T	C, S, Euthanasia, T																	
8	3																					C, S, Euthanasia, T	C, S, Euthanasia, T																	
9	3																					C, S, Euthanasia, T	C, S, Euthanasia, T																	
10	3																					C, S, Euthanasia, T	C, S, Euthanasia, T																	
HOUSING		DM-I/II		DM-II/isolator																																				

Animals seronegative for circulating Influenza viruses and Aleutian Disease will be brought into the animal facility  
 \* S = nose & throat swabs, B = blood for serum, C = clinical scoring, W = body weight, T = tissue;  
 \*\* all animals will be implanted with a pre-programmed data logger

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

**Muizen:**

Aangezien het hier nieuwe influenza virussen betreffen welke nog niet uitgetest zijn in het muizen model is nog geen spreiding van de resultaten bekend op het gebied van virale load in de longen (primaire uitleesparameter in het muizenmodel). Er kan dus geen exacte statistische berekening gedaan worden over de groepsgrootte. Als er gekeken wordt naar de publicatie van Overbaugh en Richardson (J. Virology 2005) is gekozen voor een groepsgrootte per euthanasie moment van 6 dieren, bij deze groepsgrootte zal een outlier binnen een groep geen invloed hebben op de significantie. Indien reeds data beschikbaar is van het

betreffende wild-type virus, kan dit wel gebruikt worden voor een power berekening en zal dit in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD. Wel is al beschreven dat met deze aantallen dieren een significante uitspraak gedaan kan worden over de replicatie kinetiek van het opgegroeide virus voor humaan gebruik in vergelijking met het oorspronkelijke virus in muizen (Memoli et al Clinical Infectious Diseases 2015).

#### **Fretten:**

Aangezien het hier nieuwe influenza virussen betreffen welke nog niet uitgetest zijn in het fretten model is nog geen spreiding van de resultaten bekend op het gebied van de pathologie (primaire uitleesparameter in het frettenmodel). Er kan dus geen exacte statistische berekening gedaan worden over de groepsgrootte. Per euthanasie moment zullen drie dieren gebruikt worden. Aangezien in dit experiment de verschillende groepen met elkaar vergeleken kunnen worden, is het mogelijk om de experimenten met een dergelijk laag aantal dieren per groep uit te voeren. Eerdere vergelijkbare experimenten (dose-finding van influenza virussen in fretten) hebben laten zien dat met dergelijke kleine groepen een goed onderbouwde keuze gemaakt kan worden over de dosis van het betreffende virus. De verwachting is dat in deze experimenten dergelijke aantallen ook voldoende zijn om te komen tot een gedegen uitspraak in de resultaten. Daarnaast is het zo dat in tegenstelling tot de muizen, in de fretten andere uitleesparameters (secundaire uitleesparameters) beschikbaar zijn naast de primaire uitleesparameter. Deze secundaire uitleesparameters zullen ervoor zorgen dat met kleinere groepen significante verschillen aangetoond kunnen worden tussen de groepen. Indien reeds data beschikbaar is van het betreffende wild-type virus, kan dit wel gebruikt worden voor een power berekening en zal dit in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD.

## **B. De dieren**

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

#### **Diersoort:**

- **muizen (stam nader te bepalen):** vrouwelijk en/of mannelijk van 6-8 weken oud.  
Reeds gepubliceerd onderzoek zal basis zijn voor de keuze van de muizenstam en de leeftijd. Indien deze voorkennis niet beschikbaar is, zal naar homologie gekeken worden voor de meest gevoelige muizenstam. Wat betreft het geslacht zal in eerste instantie gekeken naar beschikbare literatuur, maar indien niet beschikbaar zal gekozen worden voor gemixte groepen (mannelijk/vrouwelijk: 50/50) tenzij op voorhand bekend is dat de spreiding te groot wordt bij gebruik van verschillende geslachten.
- **Fretten:** fretten, mannelijk of vrouwelijk van 4-8 maanden oud.  
Fretten zijn gevoelig voor infectie met wild-type klinische relevante influenza virussen en derhalve worden fretten bijvoorbeeld ook regelmatig gebruikt voor het genereren van anti-sera voor het typeren van influenza virussen. Daarnaast zijn de klinische verschijnselen geobserveerd in fretten overeenkomstig met de klinische verschijnselen in mensen. Voor deze experimenten zullen vrouwelijke of mannelijke dieren gebruikt worden en de keus voor een bepaald geslacht zal bepaald worden door de beschikbaarheid van de verschillende geslachten. De beschikbaarheid van een gevalideerd model is minder van toepassing in deze dierproeven aangezien binnen deze experimenten de verschillende groepen 1:1 vergeleken worden met elkaar. Daarnaast zijn de groepen dusdanig klein in deze experimenten, dat met dergelijke aantallen niet gewerkt kan worden met gemixte groepen van mannelijke en vrouwelijke dieren. Het gebruik van gemixte groepen zal altijd gepaard gaan met grotere aantallen en is niet wenselijk in het kader van vermindering.

#### **Herkomst:** geregistreerde proefdierfokker

- Fretten: Er is een jarenlange relatie met de betreffende fokker en in overleg met de aanvrager is een huisvestingsregime opgesteld dat de influenza-specifieke seronegativiteit van de dieren waarborgt. Dit laatste garandeert dat de dieren ook daadwerkelijk geïnfecteerd kunnen worden.

#### **Geschatte aantal:**

- Muizen: 1200 dieren in 5 jaar. Er wordt verwacht om een dergelijke studie 4 keer per jaar uit te voeren voor een bepaald virus (zie hieronder voor de rechtvaardiging van het aantal virussen) in twee verschillende doseringen met per dosering vier verschillende euthanasie momenten t.o.v. een positieve en een negatieve controle die beide een enkel euthanasie moment hebben, dus een totaal aantal van 4 studies x 10 groepen van 6 dieren x 5 jaar = 1200 dieren
- Fretten: 600 dieren in 5 jaar. Er wordt verwacht om een dergelijke studie 4 keer per jaar uit te

voeren voor een bepaald virus (zie hieronder voor de rechtvaardiging van het aantal virussen) in twee verschillende doseringen met per dosering vier verschillende euthanasie momenten t.o.v. een positieve en een negatieve controle die beide een enkel euthanasie moment hebben, dus een totaal aantal van 4 studies x 10 groepen van 3 dieren x 5 jaar = 600 dieren

Bij de berekening van de aantallen is rekening gehouden met het feit dat elk jaar 4 verschillende influenza virussen circuleren (2xA en 2xB) en deze vertegenwoordigd zijn in het vaccin. Effectiviteit dient dus uitgetest te worden tegen alle vier de circulerende virussen, vandaar dat een dergelijke studie 4 keer per jaar wordt uitgevoerd.

### 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.

**Vervanging:** deze experimenten zijn opgezet om te bepalen of de virus stock die geproduceerd is voor gebruik in de mens vergelijkbaar of minder pathogeen is dan het oorspronkelijke virus. Eerste resultaten zullen verkregen worden in vitro, waarbij bestudeerd wordt of het virus daadwerkelijk infectieus is (en dus kan repliceren in een gastheer) en of het een andere groei kinetiek vertoont. Indien het virus niet infectieus is, zal het niet uitgetest worden in een proefdier. Bij verhoogde groei kinetiek kan besloten worden om het in vivo experiment niet uit te voeren (GO/NO GO beslissing). Voor het bepalen van de pathogeniciteit en replicatie in de luchtwegen is het intacte dier benodigd en daarom is dit in vitro niet na te bootsen.

**Vermindering:** voorafgaand aan het in vivo experiment, zal het virus in vitro bestudeerd worden om te bepalen of de kinetiek van de virus stock afwijkt van het oorspronkelijke virus. Indien een verhoogde replicatie/pathogeniciteit (in vitro) geobserveerd wordt, kan besloten worden om de betreffende stock niet uit te testen in vivo. Bovengenoemde groeps grootte is bepaald op basis van verwachtingen, echter indien al in vivo resultaten beschikbaar zijn voor het betreffende virus zal dit gebruikt worden voor een nieuwe power berekening. Deze zal in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD.

**Verfijning:** Meest invasieve behandelingen zullen uitgevoerd worden onder sedatie en dieren worden dagelijks geobserveerd. Indien de klinische symptomen daartoe aanleiding geven (vertonen van ademhalingsproblemen) zullen de dieren frequenter geobserveerd worden. Zo kan voorkomen worden dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment. Als er meerdere kandidaat influenza virussen zijn, zullen deze in eerste instantie het muizenmodel bestudeerd worden. Op basis van de resultaten in deze studies kan besloten worden om bepaalde influenza virussen wel (GO) of niet (NO GO) uit te testen in het frettenmodel. In het algemeen zullen alleen laag-pathogene virussen gebruikt worden in het humane challenge model, dit zal dus ook in het frettenmodel tot zeer beperkt ongerief leiden en aangezien deze virussen niet muis-geadapteerd zijn, zal het veroorzaakte ongerief ook beperkt zijn in het muizenmodel. Echter, tijdens de challenge fase kunnen klinische symptomen zeer snel tot uiting komen omdat de replicatie van influenza een logaritmische curve doormaakt. Zo kan bijvoorbeeld aan het eind van de dag besloten worden om laat op de avond nog een extra controle tijdstip in te voegen vanwege dierwelzijnsstandpunt om te voorkomen dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op



nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt worden door het feit dat de dieren gehuisvest zullen worden na infectie onder klasse II of klasse III inperking. Afval (bedding, kadavers en andere gebruikte materialen) zal aangeboden worden voor destructie.

## 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.

n.v.t. Het betreffen hier experimenten die opgelegd zijn door regelgevende instanties (en dus een wettelijke vereiste zijn) en het virus / de virussen welke uitgetest zal / zullen worden zijn elke keer verschillend van origine.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Na de operatieve plaatsing van de temperatuur loggers bij fretten zullen de dieren peri- en post operatief pijnbestrijding krijgen (meloxicam). Als gevolg van de infectie en vervolgens replicatie van het virus in de luchtwegen, is de inschatting dat de dieren geen pijn zullen ondervinden.

## I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Andere verschijnselen die de dieren kunnen vertonen, maar die niet gepaard gaan met pijn zijn:

- zijn algemene verschijnselen: gewichtsverlies en verminderd actief bij stimulatie
- respiratoire verschijnselen: een verhoogde ademhalingsfrequentie (deze zal bij verergering overgaan in stokkende/schokkende ademhaling)
- neurologische verschijnselen: verstoorde locomotie zoals een instabiele gang en/of ongecontroleerde bewegingen (deze zal bij verergering overgaan in verlamming (paresis en paralyse)).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De klachten worden veroorzaakt door infectie met het influenza virus en vervolgens replicatie in de luchtwegen (respiratoire verschijnselen) of de hersenen (neurologische verschijnselen).

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

Behalve na implantatie van de temperatuur loggers in fretten, is de inschatting is dat de dieren binnen de studie geen pijn zullen ondervinden als gevolg van de infectie (zie ook H). Daarnaast is het zo dat de meest gangbare analgetica in het algemeen naast pijnstillende ook een ontstekingsremmende werking hebben en kunnen dus interfereren in de studie. Daarom is per definitie het gebruik van dergelijke analgetica niet mogelijk in deze experimenten vanwege verstoring van de primaire uitlees parameter.

## 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.

### Muizen:

De dieren zullen dagelijks geobserveerd worden en klinische scores worden genoteerd. Bij matig ongerief (zie hieronder de inschaling van de ongerief klassen) zal het betreffende dier uit de studie worden genomen. Deze klinische ongerief classificaties zijn:

Licht: 2 algemene symptomen\*

Matig: 3 algemene symptomen\*

\* algemene symptomen: opgezette vacht, gebogen postuur en verminderd actief

### Fretten:

Tijdens de challenge fase kunnen infectie gerelateerde verschijnselen optreden welke leiden tot de volgende humane eindpunten. Bij het vertonen 1 van de volgende humane eindpunten (matig ongerief) zal het betreffende dier geëuthanaseerd worden:

1. Gewichtsverlies: na infectie worden de dieren dagelijks bemonsterd, waarbij ook de Body Score Index bepaald kan worden. Indien de dieren een voelbare vermagering hebben (ribben makkelijk palpabel), zullen ze vanuit welzijnsstandpunt dagelijks gewogen worden. Het humane eindpunt is gedefinieerd als het betreffende dier >10% gewicht verliest (geclassificeerd als matig ongerief) t.o.v. het startgewicht op de dag van challenge.
2. Respiratie: bij verergering van de ziekte zal de ademhaling veranderen van normale naar een verhoogde ademhalingsfrequentie (licht ongerief). Bij verergering van de symptomen naar stokkende / schokkende ademhaling zal het dier geëuthanaseerd worden (matig ongerief).
3. Diarree: indien in de huisvesting te zien is dat een of meerdere dieren diarree (geclassificeerd als matig) hebben, zullen alle dieren afzonderlijk beoordeeld worden om te bepalen of er aanwijzingen zijn (vuile vacht rond de anus) welke dieren daadwerkelijk diarree vertonen.

### Muizen/Fretten:

Bij de volgende verschijnselen zullen de dieren direct geëuthanaseerd worden (beide geclassificeerd als

ernstig ongerief). Zoals hieronder ook aangegeven is de kans op deze verschijnselen zeer klein en derhalve zijn deze ook niet meegenomen in het cumulatieve ongerief bij punt K.

1. Neurologisch: in enkele gevallen kan het virus vanuit de neus van het dier doorslaan naar de hersenen en zo een ontsteking van de hersenen induceren. De daarbij behorende verschijnselen zijn onstabiele gang en ongecontroleerde bewegingen (zoals beschreven in Bodewes et al 2015 AJP).

Lethargie: indien een dier lethargisch is (m.a.w. als het niet meer reageert op externe prikkels).

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

100% van alle dieren zullen licht ongerief vertonen als gevolg van de infectie met influenza virus en daarnaast zullen de fretten matig ongerief hebben als gevolg van de (herhaalde) handelingen. De verwachting is dat meer dan licht ongerief als gevolg van de infectie niet zal voorkomen (<5%) aangezien in het algemeen influenza virussen welke bedoeld zijn voor humane challenge alleen milde verschijnselen zullen vertonen en daarnaast zijn dit geen virussen welke geadapteerd zijn aan de muis, die na muis-adaptie meer pathogeen zijn dan het wild-type virus.

### K. Classificatie van ongerief

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

Het cumulatieve ongerief voor deze experimenten wordt ingeschaald op licht voor de muizen als gevolg van de infectie en matig voor de fretten als gevolg van de infectie en (herhaalde) handelingen.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Om te controleren of het virus repliceert in de longen en wat de pathologische schade is in de longen, worden deze verwijderd en verder verwerkt voor onderzoek. Dit is niet mogelijk bij in leven laten van het dier.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	90500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	2	Veiligheid van respiratoir syncytieel virus voor humaan gebruik

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Voor het onderzoek naar respiratoir syncytieel virus (RSV) is het ook mogelijk om gebruik te maken van gezonde vrijwilligers in plaats van proefdieren. Om de veiligheid van deze vrijwilligers te waarborgen is het van belang dat de virussen waarmee ze worden geïnfecteerd van te voren worden getest op virulentie en pathogeniciteit. Bij de productie van een virus stock voor gebruik in de mens wordt het betreffende virus in vitro opgegroeid. Om te kunnen garanderen dat het virus dat de mens in gaat nog steeds het zelfde fenotype heeft, zal deze eerst in dieren getest moeten. Dergelijke vereisten zijn in het algemeen omschreven in de Pharmacopeia, vertaald door Memoli et al (Clinical Infectious Diseases 2015, Appendix 1) en toegepast in de genoemde publicatie voor wat betreft het uittesten van influenza virus in muizen. Dergelijke studies voor het uittesten van RSV zijn nog niet eerder beschreven in de literatuur en derhalve zijn de studies zoals beschreven in dierproef 1 als richtlijn gebruikt voor het uittesten van RSV in de relevante diermodellen. Voor RSV zijn verschillende diermodellen beschikbaar. Het kleinst mogelijke model is de katoenrat en dit model kan goed gebruikt worden om de virus replicatie te bestuderen in de longen. Dit model kan beschouwd worden als een eerste keuze model, waarna voor een meer klinisch relevant model gekozen kan worden voor een kandidaat virus voor humaan gebruik. Indien meerdere kandidaat virus stocks beschikbaar zijn kan in het katoenrattenmodel een eerste selectie gemaakt worden op basis van virulentie. Virus stocks die meer virulentie vertonen dan de controle (het oorspronkelijke virus of de meegenomen relevante positieve controle), zullen uitgesloten worden voor humaan gebruik en dus niet verder getest worden in het frettenmodel (NO GO). Kandidaat virus stock(s) die verminderde of gelijke virulentie vertonen in vergelijking met de controle kan (kunnen) vervolgens uitgetest worden in het frettenmodel (GO). Dit frettenmodel is een meer relevant model, waarbij het ziekteverloop en de uiteindelijke pathologie vergelijkbaar is met de mens. Resultaten verkregen in het frettenmodel zijn leidend voor de veiligheid in de mens en bij verminderde of gelijke pathologie in vergelijking met de controle kan de

betreffende virus stock vrijgegeven worden voor gebruik in de mens (GO). Bij verhoogde pathologie in vergelijking met de controle zal het betreffende virus alsnog gediskwalificeerd worden voor gebruik in de mens (NO GO).

Zoals hierboven genoemd is de primaire uitkomst parameter in deze experimenten afhankelijk van het gekozen diermodel. Deze is voor de verschillende modellen:

- Katoenratten: virus replicatie in de longen (virulentie)

Fretten: long pathologie (pathogeniciteit)

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.

**Katoenratten:**

Nadat de dieren zijn aangekomen binnen de faciliteit zullen ze een acclimatisatie periode hebben van minimaal 1 week. Dieren worden voor de proef gewogen, geïdentificeerd door middel van oorknip en er wordt bloed afgenomen via de wangprik (~100ul) voor serum (het zogenaamde nul-monster). Deze hoeveelheid serum (~50ul) is voldoende om in het geval van onverwachte resultaten op basis van serologie uit te sluiten dat de dieren op voorhand een immunologische respons hadden die van invloed zou kunnen zijn op de infectie. Daarnaast zal dit nul-monster ook dienen als referentie in de serologische analyses. Nadat de dieren zijn gesedeerd (isofluraan 3-4%), worden de dieren intranasaal (50µL) geïnoculeerd. Op een aantal vroege tijdstippen na inoculatie worden een aantal dieren van iedere groep geëuthanaseerd, waarna de longen worden verzameld. Deze vroege tijdstippen zijn gekozen om tijdens de log-fase van de virus replicatie te bestuderen of er verschillen zijn tussen de verschillende doseringen/virussen op basis van virulentie en pathologie. Het tijdstip van dit vroege moment zal afhangen van het betreffende virus en zal bepaald worden op basis van reeds beschikbare data of via literatuur onderzoek. De overgebleven dieren worden aan het einde van het experiment (dag 14) geëuthanaseerd en ook hier worden de longen verzameld voor virologie en pathologie. Dit late tijdstip is gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. Het eerste (verlengde uitscheiding van het virus) zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus. Tijdens de gehele studie worden de dieren dagelijks gewogen en wordt er gekeken naar klinische verschijnselen. Daarnaast zullen dieren vroegtijdig uit de studie worden gehaald indien het humane eindpunt wordt bereikt. Hieronder is een voorbeeld van een dergelijke studie waarin een bepaald(e) RSV dosis (doses) getest wordt in katoenratten. Daarnaast zal in een dergelijke studie een negatieve en een positieve controle meegenomen worden. De positieve controle dient om de vergelijking te maken met het uit te testen virus en de negatieve controle als nul-referentie ten opzichte van de geïnfecteerde dieren. Voor beide controles zal het tijdstip van euthanasie beschreven en beargumenteerd worden in het werkprotocol.

		Infection phase																				
Group	No/Group	d -7	d -1	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14				
1	6	entry of animals in the preclinical facility	C,W, B	Intranasal Administration of RSV, C, W	C,W	C,W	C, B, W, Euthanasia, T															
2	6						C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T													
3	6						C, W	C, W	C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T											
4	6						C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T	
HOUSING		DM-II	DM-II																			

\* W = body weight, B = blood for serum, C = clinical scoring, T = tissue;

**Fretten:**

Nadat de dieren zijn aangekomen binnen de faciliteit zullen ze een acclimatisatie periode hebben van minimaal 1 week. Minimaal 14 dagen voor de start van het experiment zal een zgn. nul-bloedmonster voor referentie in analyses afgenomen worden onder sedatie via de vena jugularis. Dit serum zal gebruikt worden om in het geval van onverwachte resultaten op basis van serologie uit te sluiten dat de dieren op voorhand een immunologische respons hadden die van invloed zou kunnen zijn op de infectie. Daarnaast zal dit nul-monster ook dienen als referentie in de serologische analyses. Hierna zal een datalogger ingebracht worden.

Dit zal gebeuren door middel van een operatie waarbij de buikwand geopend zal worden en de temperatuurlogger via de linea alba in de peritoneale holte geplaatst zal worden waarna de wond gehecht wordt. Deze datalogger meet de lichaamstemperatuur en/of activiteit van het dier gedurende de looptijd van de studie (klinische parameter). Peri- en postoperatief zullen de dieren topicale pijnbestrijding krijgen om het genezingsproces te bevorderen en na afloop van de operatie zal de werking van de anesthesie geantagoneerd worden. Deze dataloggers worden gebruikt aangezien fretten (zeker bij milde infecties) klinisch niet duidelijk te scoren zijn ondanks het feit dat in de pathologie (zowel gross als microscopisch) wel degelijk veranderingen te zien zijn. De aldus verkregen data (temperatuur en/of activiteit) dragen bij het analyseren van het model, primaire en secundaire uitleesparameters. Op dag -1 zullen alle dieren gewogen en bemonsterd (neus en keel) worden en op dag 0 via de intranasale route geïnoculeerd worden met een volume van 300ul. Het nul-monster wordt een dag voor de daadwerkelijke inoculatie uitgevoerd om geen interferentie te hebben met de inoculatie zelf. Aangezien hier een uitspraak gedaan zal worden over de veiligheid in gebruik bij de mens, wordt ook de route identiek gehouden (ter vergelijking: een dergelijk challenge in mensen wordt ook via de intranasale route gegeven). Na infectie zal de anesthesie geantagoneerd worden en zullen de dieren dagelijks bemonsterd worden uit de bovenste luchtwegen (keel en neus) onder anesthesie en zal de Body Score Index bepaald worden. Bij makkelijk palpabele ribben zal besloten worden om vanuit welzijnsstandpunt de dieren te wegen tijdens hetzelfde anesthesie moment. Op gezette tijden na infectie (of eerder indien een dier het humane eindpunt bereikt) zullen dieren geëuthanaseerd worden voor het verzamelen van relevant weefsel. De overgebleven dieren worden aan het einde van het experiment (dag 14) geëuthanaseerd en ook hier worden de longen verzameld. Dit late tijdstip is gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. Het eerste (verlengde uitscheiding van het virus) zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus. Daarnaast zullen de dieren dagelijks tot het einde van de proef geobserveerd worden om te bepalen of er klinische verschijnselen te zien zijn. Hieronder is een voorbeeld van een dergelijke studie waarin twee verschillende (doses van) RSV getest wordt in fretten in vergelijking met een positieve en een negatieve controle. De route van de negatieve dan wel positieve controle kan afwijken van de route voor de uit te testen virus stock (bijvoorbeeld intratracheaal of zowel intratracheaal als intrasasaal), dit zal op geleide van historische gegevens gaan en zal beargumenteerd worden in het werkprotocol.

		Preparation*		Challenge & Sampling**																						
Group	No./Group	d -21	d -14**	d -1	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14							
1	3	entry of animals into the preclinical facility	Implantation data logger, B*	W	C, S	C, S	Negative control	C, S	C, S	C, S	C	C, S	C	C	C, S	C	C	C	C, B, S, Euthanasia, T							
2	3							C, S, Euthanasia, T																		
3	3							Virus (dose) 1	C, S	C, S	C, S, Euthanasia, T															
4	3								C, S	C, S	C, S	C	C, B, S, Euthanasia, T													
5	3							Virus (dose) 2	C, S	C, S	C, S	C	C, S	C	C	C	C, S	C	C	C	C	C	C	C, B, S, Euthanasia, T		
6	3								C, S, Euthanasia, T																	
7	3							Virus (dose) 2	C, S	C, S	C, S, Euthanasia, T															
8	3								C, S	C, S	C, S	C	C, B, S, Euthanasia, T													
9	3							Positive control	C, S	C, S	C, S	C	C, S	C	C	C	C, S	C	C	C	C	C	C	C, B, S, Euthanasia, T		
10	3								C, S	C, S	C, S, Euthanasia, T															
HOUSING		DM-I/II		DM-II/isolator																						

Animals seronegative for RSV and Aleutian Disease will be brought into the animal facility  
 \* S = nose & throat swabs, B = blood for serum, C = clinical scoring, W = body weight, T = tissue;  
 \*\* all animals will be implanted with a pre-programmed data logger

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

**Katoenratten:**

Aangezien het hier nieuwe RSV isolaten betreffen welke nog niet uitgetest zijn in het katoenratten model is nog geen spreiding van de resultaten bekend op het gebied van virale load in de longen (primaire uitleesparameter in het katoenrattenmodel). Er kan dus geen exacte statistische berekening gedaan worden over de groepsgrootte. Als er gekeken wordt naar de publicatie van Overbaugh en Richardson (J. Virology

2005) is gekozen voor een groepsgrootte per euthanasie moment van 6 dieren, bij deze groepsgrootte zal een outlier binnen een groep geen invloed hebben op de significantie. Indien reeds data beschikbaar is van het betreffende wild-type virus, kan dit wel gebruikt worden voor een power berekening en zal dit in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD. Naar analogie met influenza in muizen is wel al beschreven dat met deze aantallen dieren een significante uitspraak gedaan kan worden over de replicatie kinetiek van het opgegroeide virus voor humaan gebruik in vergelijking met het oorspronkelijke virus in muizen (Memoli et al Clinical Infectious Diseases 2015).

#### **Fretten:**

Aangezien het hier nieuwe RSV isolaten betreffen welke nog niet uitgetest zijn in het fretten model is nog geen spreiding van de resultaten bekend op het gebied van de pathologie (primaire uitleesparameter in het frettenmodel). Er kan dus geen exacte statistische berekening gedaan worden over de groepsgrootte. Per euthanasie moment zullen drie dieren gebruikt worden. Aangezien in dit experiment de verschillende groepen met elkaar vergeleken kunnen worden, is het mogelijk om de experimenten met een dergelijk laag aantal dieren per groep uit te voeren. Eerdere vergelijkbare experimenten (dose-finding van influenza virussen in fretten) hebben laten zien dat met dergelijke kleine groepen een goed onderbouwde keuze gemaakt kan worden over de dosis van het betreffende virus. De verwachting is dat in deze experimenten dergelijke aantallen ook voldoende zijn om te komen tot een gedegen uitspraak in de resultaten. Daarnaast is het zo dat in tegenstelling tot de muizen, in de fretten andere uitleesparameters (secundaire uitleesparameters) beschikbaar zijn naast de primaire uitleesparameter. Deze secundaire uitleesparameters zullen ervoor zorgen dat met kleinere groepen significante verschillen aangetoond kunnen worden tussen de groepen. Indien reeds data beschikbaar is van het betreffende wild-type virus, kan dit wel gebruikt worden voor een power berekening en zal dit in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD.

#### **B. De dieren**

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

##### **Diersoort:**

- **Katoenratten:** vrouwelijk en/of mannelijk van 6-8 weken oud.  
Reeds gepubliceerd en eerder door de aanvragen uitgevoerd onderzoek heeft aangetoond dat katoenratten gevoelig zijn voor infectie met RSV. De eerste studie welke uitgevoerd wordt binnen deze aanvraag zal uitgevoerd worden met gemixte groepen. De resultaten verkregen in dit experiment zullen leidend zijn voor de keus van geslacht in vervolg experimenten.
- **Fretten:** fretten, mannelijk of vrouwelijk van 4-8 maanden oud.  
Fretten zijn gevoelig voor infectie met wild-type RSV isolaten (eigen uitgevoerd onderzoek). De klinische verschijnselen geobserveerd in fretten zijn overeenkomstig met de klinische verschijnselen in mensen. Voor deze experimenten zullen vrouwelijke of mannelijke dieren gebruikt worden en de keus voor een bepaald geslacht zal bepaald worden door de beschikbaarheid van de verschillende geslachten. De beschikbaarheid van een gevalideerd model is minder van toepassing in deze dierproeven aangezien binnen deze experimenten de verschillende groepen 1:1 vergeleken worden met elkaar. Daarnaast zijn de groepen dusdanig klein in deze experimenten, dat met dergelijke aantallen niet gewerkt kan worden met gemixte groepen van mannelijke en vrouwelijke dieren. Het gebruik van gemixte groepen zal altijd gepaard gaan met grotere aantallen en is niet wenselijk in het kader van vermindering.

##### **Herkomst:** geregistreerde proefdierfokker

- Fretten: Er is een jarenlange relatie met de betreffende fokker en in overleg met de aanvrager is een huisvestingsregime opgesteld dat de RSV-specifieke seronegativiteit van de dieren waarborgt. Dit laatste garandeert dat de dieren ook daadwerkelijk geïnfecteerd kunnen worden.

##### **Geschatte aantal:**

- Katoenratten: 600 dieren in 5 jaar. Er wordt verwacht om een dergelijke studie 2 keer per jaar uit te voeren voor een bepaald virus (zie hieronder voor de rechtvaardiging van het aantal virussen) in twee verschillende doseringen met per dosering vier verschillende euthanasie momenten t.o.v. een positieve en een negatieve controle die beide een enkel euthanasie moment hebben, dus een totaal aantal van 2 studies x 10 groepen van 6 dieren x 5 jaar = 600 dieren
- Fretten: 300 dieren in 5 jaar. Er wordt verwacht om een dergelijke studie 2 keer per jaar uit te voeren voor een bepaald virus (zie hieronder voor de rechtvaardiging van het aantal virussen) in

twee verschillende doseringen met per dosering vier verschillende euthanasie momenten t.o.v. een positieve en een negatieve controle die beide een enkel euthanasie moment hebben, dus een totaal aantal van 2 studies x 10 groepen van 3 dieren x 5 jaar = 300 dieren

Bij de berekening van de aantallen is rekening gehouden met het feit dat elk jaar 2 verschillende RSV virussen circuleren (1xA en 1xB). Effectiviteit dient dus uitgetest te worden tegen allebei de circulerende virussen, vandaar dat een dergelijke studie 2 keer per jaar wordt uitgevoerd.

### 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.

**Vervanging:** deze experimenten zijn opgezet om te bepalen of de virus stock die geproduceerd is voor gebruik in de mens vergelijkbaar of minder pathogeen is dan het oorspronkelijke virus. Eerste resultaten zullen verkregen worden in vitro, waarbij bestudeerd wordt of het virus daadwerkelijk infectieus is (en dus kan repliceren in een gastheer) en of het een andere groei kinetiek vertoont. Indien het virus niet infectieus is, zal het niet uitgetest worden in een proefdier. Bij verhoogde groei kinetiek kan besloten worden om het in vivo experiment niet uit te voeren (GO/NO GO beslissing). Voor het bepalen van de pathogeniciteit en replicatie in de luchtwegen is het intacte dier benodigd en daarom is dit in vitro niet na te bootsen.

**Vermindering:** voorafgaand aan het in vivo experiment, zal het virus in vitro bestudeerd worden om te bepalen of de kinetiek van de virus stock afwijkt van het oorspronkelijke virus. Indien een verhoogde replicatie/pathogeniciteit (in vitro) geobserveerd wordt, kan besloten worden om de betreffende stock niet uit te testen in vivo. Bovengenoemde groeps grootte is bepaald op basis van verwachtingen, echter indien al in vivo resultaten beschikbaar zijn voor het betreffende virus zal dit gebruikt worden voor een nieuwe power berekening. Deze zal in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD.

**Verfijning:** Meest invasieve behandelingen zullen uitgevoerd worden onder sedatie en dieren worden dagelijks geobserveerd. Indien de klinische symptomen daartoe aanleiding geven (vertonen van ademhalingsproblemen) zullen de dieren frequenter geobserveerd worden. Zo kan voorkomen worden dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment. Als er meerdere kandidaat RSV virussen zijn, zullen deze in eerste instantie het katoenrattenmodel bestudeerd worden. Op basis van de resultaten in deze studies kan besloten worden om bepaalde RSV virussen wel (GO) of niet (NO GO) uit te testen in het frettenmodel. In het algemeen is RSV een laag-pathogeen virus, daarom zal het veroorzaakte ongerief ook beperkt zijn in beide modellen. Echter, tijdens de challenge fase kunnen klinische symptomen zeer snel tot uiting komen omdat de replicatie van RSV een logaritmische curve doormaakt. Zo kan bijvoorbeeld aan het eind van de dag besloten worden om laat op de avond nog een extra controle tijdstip in te voegen vanwege dierwelzijnsstandpunt om te voorkomen dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment.

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

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt worden door het feit dat de dieren gehuisvest zullen worden na infectie onder klasse II of klasse III inperking. Afval (bedding, kadavers en andere gebruikte materialen) zal aangeboden worden voor destructie.



---

## 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.

n.v.t. Het betreffen hier experimenten die opgelegd zijn door regelgevende instanties (en dus een wettelijke vereiste zijn) en het virus / de virussen welke uitgetest zal / zullen worden zijn elke keer verschillend van origine.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Na de operatieve plaatsing van de temperatuur loggers bij fretten zullen de dieren peri- en post operatief pijnbestrijding krijgen (meloxicam). Als gevolg van de infectie en vervolgens replicatie van het virus in de luchtwegen, is de inschatting dat de dieren geen pijn zullen ondervinden.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Andere verschijnselen die de dieren kunnen vertonen, maar die niet gepaard gaan met pijn zijn:

- zijn algemene verschijnselen: gewichtsverlies en verminderd actief bij stimulatie

- respiratoire verschijnselen: een verhoogde ademhalingsfrequentie (deze zal bij verergering overgaan in stokkende/schokkende ademhaling)

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De klachten worden veroorzaakt door infectie met RSV en vervolgens replicatie in de luchtwegen (respiratoire verschijnselen).

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

Behalve na implantatie van de temperatuur loggers in fretten, is de inschatting is dat de dieren binnen de studie geen pijn zullen ondervinden als gevolg van de infectie (zie ook H). Daarnaast is het zo dat de meest gangbare analgetica in het algemeen naast pijnstillende ook een ontstekingsremmende werking hebben en kunnen dus interfereren in de studie. Daarom is per definitie het gebruik van dergelijke analgetica niet mogelijk in deze experimenten vanwege verstoring van de primaire uitlees parameter.

### 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.

#### Katoenratten:

De dieren zullen dagelijks geobserveerd worden en klinische scores worden genoteerd. Bij matig ongerief (zie hieronder de inschaling van de ongerief klassen) zal het betreffende dier uit de studie worden genomen. Deze klinische ongerief klassificaties zijn:

Licht: 2 algemene symptomen\*

Matig: 3 algemene symptomen\*

\* algemene symptomen: opgezette vacht, gebogen postuur en verminderd actief

#### Fretten:

Tijdens de challenge fase kunnen infectie gerelateerde verschijnselen optreden welke leiden tot de volgende humane eindpunten. Bij het vertonen 1 van de volgende humane eindpunten (matig ongerief) zal het betreffende dier geëuthanaseerd worden:

1. Gewichtsverlies: na infectie worden de dieren dagelijks bemonsterd, waarbij ook de Body Score Index bepaald kan worden. Indien de dieren een voelbare vermagering hebben (ribben makkelijk palpabel), zullen ze vanuit welzijnsstandpunt dagelijks gewogen worden. Het humane eindpunt is gedefinieerd als het betreffende dier >10% gewicht verliest (geclassificeerd als matig ongerief) t.o.v. het startgewicht op de dag van challenge.
2. Respiratie: bij verergering van de ziekte zal de ademhaling veranderen van normale naar een verhoogde ademhalingsfrequentie (licht ongerief). Bij verergering van de symptomen naar stokkende / schokkende ademhaling zal het dier geëuthanaseerd worden (matig ongerief).

#### Katoenratten/Fretten:

Bij de volgende verschijnselen zullen de dieren direct geëuthanaseerd worden (geclassificeerd als ernstig ongerief). Zoals hieronder ook aangegeven is de kans op deze verschijnselen zeer klein en derhalve zijn deze ook niet meegenomen in het cumulatieve ongerief bij punt K. Lethargie: indien een dier lethargisch is (m.a.w. als het niet meer reageert op externe prikkels).

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

100% van alle dieren zullen licht ongerief vertonen als gevolg van de infectie met RSV en daarnaast zullen de fretten matig ongerief hebben als gevolg van de (herhaalde) handelingen. De verwachting is dat meer dan licht ongerief als gevolg van de infectie niet zal voorkomen (<5%) aangezien in het algemeen RSV alleen milde infectie zal induceren in katoenratten en fretten.

### K. Classificatie van ongerief

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

Het cumulatieve ongerief voor deze experimenten wordt ingeschaald op licht voor de katoenratten als gevolg van de infectie en matig voor de fretten als gevolg van de infectie en (herhaalde) handelingen.

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Om te controleren of het virus repliceert in de longen en wat de pathologische schade is in de longen, worden deze verwijderd en verder verwerkt voor onderzoek. Dit is niet mogelijk bij in leven laten van het dier.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	90500				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Volgnummer</th> <th>Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3</td> <td>Veiligheid van rhinovirus voor humaan gebruik</td> </tr> </tbody> </table>	Volgnummer	Type dierproef	3	Veiligheid van rhinovirus voor humaan gebruik
Volgnummer	Type dierproef					
3	Veiligheid van rhinovirus voor humaan gebruik					

*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.

Voor het onderzoek naar rhinovirus is het ook mogelijk om gebruik te maken van gezonde vrijwilligers in plaats van proefdieren. Om de veiligheid van deze vrijwilligers te waarborgen is het van belang dat het virus waarmee ze worden geïnfecteerd van te voren worden getest op virulentie en pathogeniciteit. Bij de productie van een virus stock voor gebruik in de mens wordt het betreffende virus in vitro opgegroeid. Om te kunnen garanderen dat het virus dat de mens in gaat nog steeds het zelfde fenotype heeft, zal deze eerst in dieren getest moeten. Dergelijke vereisten zijn in het algemeen omschreven in de Pharmacopeia, vertaald door Memoli et al (Clinical Infectious Diseases 2015, Appendix 1) en toegepast in de genoemde publicatie voor wat betreft het uittesten van influenza virus in muizen. Dergelijke studies voor het uittesten van rhinovirus zijn nog niet eerder beschreven in de literatuur en derhalve zijn de studies zoals beschreven in dierproef 1 als richtlijn gebruikt voor het uittesten van rhinovirus in het relevante diermodel. Voor rhinovirus is vooralsnog maar één diermodel beschikbaar, namelijk de katoenrat. Dit model kan goed gebruikt worden om de virus replicatie te bestuderen in de longen. Virus stocks die meer virulentie vertonen dan de controle (het oorspronkelijke virus of de meegenomen relevante positieve controle), zullen uitgesloten worden voor humaan gebruik (NO GO). Virus stock(s) die verminderde of gelijke virulentie vertonen in vergelijking met de controle kunnen vrijgegeven worden voor gebruik in de mens (GO).

De primaire uitkomst parameter in deze experimenten is: virus replicatie in de longen (virulentie).

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.

#### Katoenratten:

Nadat de dieren zijn aangekomen binnen de faciliteit zullen ze een acclimatisatie periode hebben van minimaal 1 week. Dieren worden voor de proef gewogen, geïdentificeerd door middel van oorknip en er wordt bloed afgenomen via de wangprik (~100ul) voor serum (het zogenaamde nul-monster). Deze

hoeveelheid serum (~50ul) is voldoende om in het geval van onverwachte resultaten op basis van serologie uit te sluiten dat de dieren op voorhand een immunologische respons hadden die van invloed zou kunnen zijn op de infectie. Daarnaast zal dit nul-monster ook dienen als referentie in de serologische analyses. Nadat de dieren zijn gesedeerd (isofluraan 3-4%), worden de dieren intranasaal (50µL) geïnoculeerd. Op een aantal vroege tijdstippen na inoculatie worden een aantal dieren van iedere groep geëuthanaseerd, waarna de longen worden verzameld. Deze vroege tijdstippen zijn gekozen om tijdens de log-fase van de virus replicatie te bestuderen of er verschillen zijn tussen de verschillende doseringen/virussen op basis van virulentie en pathologie. De overgebleven dieren worden aan het einde van het experiment (dag 14) geëuthanaseerd en ook hier worden de longen verzameld voor virologie en pathologie. Dit late tijdstip is gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. Het eerste (verlengde uitscheiding van het virus) zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus. Tijdens de gehele studie worden de dieren dagelijks gewogen en wordt er gekeken naar klinische verschijnselen. Daarnaast zullen dieren vroegtijdig uit de studie worden gehaald indien het humane eindpunt wordt bereikt. Hieronder is een voorbeeld van een dergelijke studie waarin een bepaald(e) rhinovirus dosis (doses) getest wordt in katoenratten. Daarnaast zal in een dergelijke studie een negatieve en een positieve controle meegenomen worden. De positieve controle dient om de vergelijking te maken met het uit te testen virus en de negatieve controle als nul-referentie ten opzichte van de geïnfecteerde dieren. Voor beide controles zal het tijdstip van euthanasie beschreven en beargumenteerd worden in het werkprotocol.

		Infection phase																			
Group	No/Group	d -7																			
			d -1	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14			
1	6	entry of animals in the preclinical facility	C,W, B	Intranasal Administration of RSV, C, W	C,W	C,W	C, B, W, Euthanasia, T														
2	6						C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T												
3	6						C, W	C, W	C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T										
4	6						C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T
HOUSING		DM-II	DM-II																		

\* W = body weight, B = blood for serum, C = clinical scoring, T = tissue;

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

Aangezien het hier nieuw opgegroeide rhinovirussen betreffen welke nog niet uitgetest zijn in het katoenratten model is nog geen spreiding van de resultaten bekend op het gebied van virale load in de longen (primaire uitleesparameter in het katoenrattenmodel). Er kan dus geen exacte statistische berekening gedaan worden over de groeps grootte. Als er gekeken wordt naar de publicatie van Overbaugh en Richardson (J. Virology 2005) is gekozen voor een groeps grootte per euthanasie moment van 6 dieren, bij deze groeps grootte zal een outlier binnen een groep geen invloed hebben op de significantie. Indien reeds data beschikbaar is van het betreffende wild-type virus, kan dit wel gebruikt worden voor een gedegen power berekening en zal dit in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD. Naar analogie met influenza in muizen is wel al beschreven dat met deze aantallen dieren een significante uitspraak gedaan kan worden over de replicatie kinetiek van het opgegroeide virus voor humaan gebruik in vergelijking met het oorspronkelijke virus in muizen (Memoli et al Clinical Infectious Diseases 2015).

## B. De dieren

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

### Diersoort:

- Katoenratten:** vrouwelijk of mannelijk van 6-8 weken oud.  
 Reeds gepubliceerd onderzoek heeft aangetoond dat katoenratten gevoelig zijn voor infectie met rhinovirus. De eerste studie welke uitgevoerd wordt binnen deze aanvraag zal uitgevoerd worden met gemixte groepen. De resultaten verkregen in deze eerste studie zullen leidend zijn voor de keus

van geslacht in vervolg experimenten.

**Herkomst:** geregistreerde proefdierfokker

**Geschatte aantal:**

- Katoenratten: 300 dieren in 5 jaar. Er wordt verwacht om een dergelijke studie 1 keer per jaar uit te voeren voor een bepaald virus (zie hieronder voor de rechtvaardiging van dit aantal) in twee verschillende doseringen met per dosering vier verschillende euthanasie momenten t.o.v. een positieve en een negatieve controle die beide een enkel euthanasie moment hebben, dus een totaal aantal van 1 studie x 10 groepen van 6 dieren x 5 jaar = 300 dieren.

In tegenstelling tot de virussen benoemd in bijlage 1 (influenza) en 2 (RSV) is er voor rhinovirus maar 1 type beschikbaar dat gebruikt kan worden in het humane challenge model.

**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.

**Vervanging:** deze experimenten zijn opgezet om te bepalen of de virus stock die geproduceerd is voor gebruik in de mens vergelijkbaar of minder pathogeen is dan het oorspronkelijke virus. Eerste resultaten zullen verkregen worden in vitro, waarbij bestudeerd wordt of het virus daadwerkelijk infectieus is (en dus kan repliceren in een gastheer) en of het een andere groei kinetiek vertoont. Indien het virus niet infectieus is, zal het niet uitgetest worden in een proefdier. Bij verhoogde groei kinetiek kan besloten worden om het in vivo experiment niet uit te voeren (GO/NO GO beslissing). Voor het bepalen van de replicatie in de luchtwegen is het intacte dier benodigd en daarom is dit in vitro niet na te bootsen.

**Vermindering:** voorafgaand aan het in vivo experiment, zal het virus in vitro bestudeerd worden om te bepalen of de kinetiek van de virus stock afwijkt van het oorspronkelijke virus. Indien een verhoogde replicatie/pathogeniciteit (in vitro) geobserveerd wordt, kan besloten worden om de betreffende stock niet uit te testen in vivo. Bovengenoemde groepsgrootte is bepaald op basis van verwachtingen, echter indien al in vivo resultaten beschikbaar zijn voor het betreffende virus zal dit gebruikt worden voor een nieuwe power berekening. Deze zal in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD.

**Verfijning:** Meest invasieve behandelingen zullen uitgevoerd worden onder sedatie en dieren worden dagelijks geobserveerd. Indien de klinische symptomen daartoe aanleiding geven (vertonen van ademhalingsproblemen) zullen de dieren frequenter geobserveerd worden. Zo kan voorkomen worden dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment. In het algemeen is rhinovirus een laag-pathogeen virus, daarom zal het veroorzaakte ongerief ook beperkt zijn. Echter, tijdens de challenge fase kunnen klinische symptomen zeer snel tot uiting komen omdat de replicatie van rhinovirus een logaritmische curve doormaakt. Zo kan bijvoorbeeld aan het eind van de dag besloten worden om laat op de avond nog een extra controle tijdstip in te voegen vanwege dierwelzijnsstandpunt om te voorkomen dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment.

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

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt worden door het feit dat de dieren gehuisvest zullen worden na infectie onder klasse II of klasse III inperking. Afval (bedding, kadavers en andere gebruikte materialen) zal aangeboden worden voor destructie.

## 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.

n.v.t. Het betreffen hier experimenten betreffen die opgelegd zijn door regelgevende instanties (en dus een wettelijke vereiste zijn) en het virus welke uitgetest wordt zal elke keer verschillend zijn van origine.

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

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Andere verschijnselen die de dieren kunnen vertonen, maar die niet gepaard gaan met pijn zijn:

- zijn algemene verschijnselen: gewichtsverlies en verminderd actief bij stimulatie
- respiratoire verschijnselen: een verhoogde ademhalingsfrequentie (deze zal bij verergering overgaan in stokkende/schokkende ademhaling)

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De klachten worden veroorzaakt door infectie met rhinovirus en vervolgens replicatie in de luchtwegen (respiratoire verschijnselen).

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

De inschatting is dat de dieren binnen de studie geen pijn zullen ondervinden als gevolg van de infectie. Daarnaast is het zo dat de meest gangbare analgetica in het algemeen naast pijnstillende ook een ontstekingsremmende werking hebben en kunnen dus interfereren in de studie. Daarom is per definitie het gebruik van dergelijke analgetica niet mogelijk in deze experimenten vanwege verstoring van de primaire uitlees parameter.

### 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.

De dieren zullen dagelijks geobserveerd worden en klinische scores worden genoteerd. Bij matig ongerief (zie hieronder de inschaling van de ongerief klassen) zal het betreffende dier uit de studie worden genomen. Deze klinische ongerief klassificaties zijn:

Licht: 2 algemene symptomen\*

Matig: 3 algemene symptomen\*

\* algemene symptomen: opgezette vacht, gebogen postuur en verminderd actief

Bij de volgende verschijnselen zullen de dieren direct geëuthanaseerd worden (geclassificeerd als ernstig ongerief). Zoals hieronder ook aangegeven is de kans op deze verschijnselen zeer klein en derhalve zijn deze ook niet meegenomen in het cumulatieve ongerief bij punt K.

1. Lethargie: indien een dier lethargisch is (m.a.w. als het niet meer reageert op externe prikkels).

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

100% van de dieren zullen licht ongerief vertonen als gevolg van de infectie met rhinovirus. De verwachting is dat meer dan licht ongerief niet zal voorkomen (<5%) aangezien in het algemeen rhinovirus alleen milde infectie zal induceren in katoenratten.

### K. Classificatie van ongerief

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

Het cumulatieve ongerief voor deze experimenten wordt ingeschaald op licht.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Om te controleren of het virus repliceert in de longen en wat de pathologische schade is in de longen, worden deze verwijderd en verder verwerkt voor onderzoek. Dit is niet mogelijk bij in leven laten van het dier.

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

**Centrale Commissie Dierproeven**

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

Nistelrooise Baan 3  
5347 RE SCHAIJK

**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  
AVD905002016413

**Uw referentie**

**Bijlagen**

1

Datum 8 juni 2016

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 30 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Uittesten van veiligheid van respiratoire humane challenge virussen in verschillende proefdier modellen" met aanvraagnummer AVD905002016413. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 24 mei 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft de documenten van de projectaanvraag op ons verzoek opnieuw opgestuurd. Dit omdat uit het advies van de DEC volgt dat de aanvraag op basis van correspondentie met de DEC is aangepast.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden en het voorschrift zoals genoemd in de vergunning. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. In de bijlagen 3.4.4.2 en 3.4.4.3 beschrijft u dat u voor de katoenratten een eerste experiment met beide geslachten uitvoert. Op basis van de uitkomsten van deze eerste experimenten komt u tot de conclusie welk geslacht, of welke geslachten u voor vervolgexperimenten wil inzetten. Een besluit over deze keuze kan niet aan de IvD gemandateerd worden. Na het uitvoeren van de eerste experimenten dient u middels een wijziging bij de CCD beargumenteerd terug te koppelen welk geslacht of welke geslachten u voor de vervolgexperimenten gaat inzetten. U kunt met uw project "Uittesten van veiligheid van respiratoire humane challenge virussen in verschillende proefdier modellen" starten. De vergunning wordt afgegeven van 8 juni 2016 tot en met 30 april 2021. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie [REDACTED]. Dit advies is opgesteld op 20 mei 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Aanvullend worden de twee algemene voorwaarden en een voorschrift aan de vergunning verbonden. Het DEC-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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

[REDACTED]  
Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

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

### **Bijlagen**

- Vergunning

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
Naam: BioXpert bv  
Adres: Nistelrooise Baan 3  
Postcode en woonplaats: 5347 RE Schaijk  
Deelnemersnummer: 90500

deze projectvergunning voor het tijdvak 8 juni 2016 tot en met 30 april 2021, voor het project "Uittesten van veiligheid van respiratoire humane challenge virussen in verschillende proefdier modellen" met aanvraagnummer AVD905002016413, volgens advies van Dierexperimentencommissie [REDACTED]  
[REDACTED] De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

Voor de uitvoering van het project is Voorzitter IvD verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 30 maart 2016
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 24 mei 2016;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 24 mei 2016;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 20 mei 2016, ontvangen op 20 mei 2016;
  - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 24 mei 2016.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Veiligheid van influenza virus voor humaan gebruik	Muizen ( <i>Mus musculus</i> )	1200	Licht
Veiligheid van influenza virus voor humaan gebruik	Fretten ( <i>Mustela putorius furo</i> )	600	Matig
Veiligheid van respiratoir syncytieel virus voor humaan gebruik	Andere knaagdieren (andere Rodentia) / Katoenratten	600	Licht
Veiligheid van respiratoir syncytieel virus voor humaan gebruik	Fretten ( <i>Mustela putorius furo</i> )	300	Matig
Veiligheid van rhinovirus voor humaan gebruik	Andere knaagdieren (andere Rodentia) / Katoenratten	300	Licht

### Voorwaarden

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

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

**Datum**  
8 juni 2016

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD905002016413

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.

#### **Voorschrift**

In de bijlagen 3.4.4.2 en 3.4.4.3 beschrijft u dat u voor de katoenratten een eerste experiment met beide geslachten uitvoert. Op basis van de uitkomsten van deze eerste experimenten komt u tot de conclusie welk geslacht, of welke geslachten u voor vervollexperimenten wil inzetten. Een besluit over deze keuze kan niet aan de IvD gemandateerd worden. Na het uitvoeren van de eerste experimenten dient u middels een wijziging bij de CCD beargumenteerd terug te koppelen welk geslacht of welke geslachten u voor de vervollexperimenten gaat inzetten.

## **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 verdooving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdooving 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 verdooving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdooving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdooving 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 verdooving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdooving 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

**Datum**  
8 juni 2016

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD905002016413

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.