

02 MAART 2016



Centrale Commissie Dierproeven

AVD401002016416

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? Ja > Vul uw deelnemernummer in 40100
 Nee > U kunt geen aanvraag doen
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

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

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

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

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

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

(Titel) Naam en voorletters

Dhr. Mw.

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging mee met deze aanvraag*

Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3

Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2

Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?

Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier

Nee > Ga verder met vraag 3

- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?

Nee > Ga verder met vraag 3

Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?

Startdatum 1 - 5 - 2016

Einddatum 1 - 6 - 2017

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Effects of nutrition on lung and systemic immunity and disease susceptibility

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

Invloed van voeding op immuniteit en longgezondheid bij kalveren en varkens

- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?

Naam DEC DEC Wageningen UR

Postadres Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen

E-mailadres dec@wur.nl

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1187 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 + 2 bijlagen
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- Bestelorder WUR939832

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

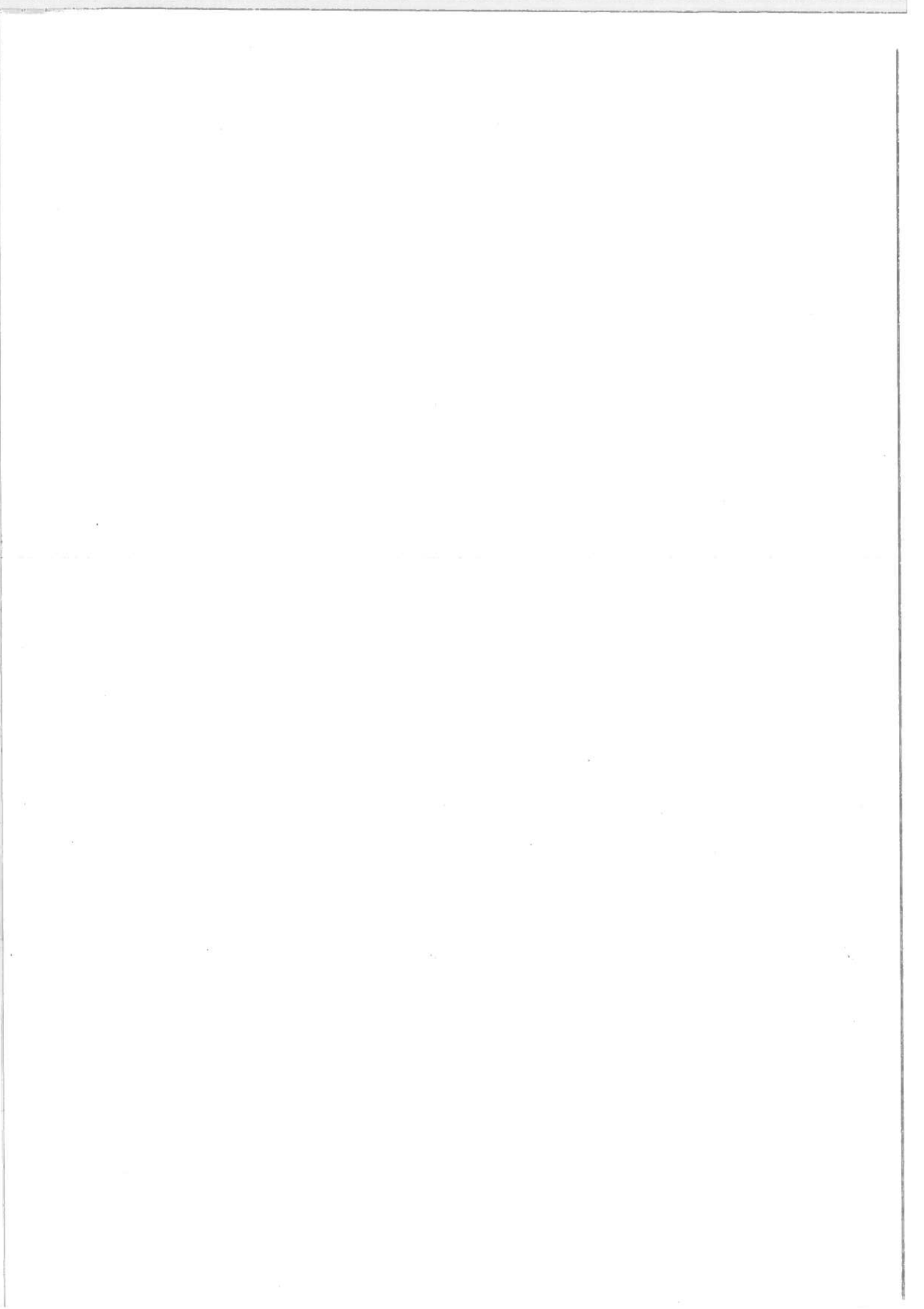
Naam 

Functie 

Plaats Wageningen

Datum 1 - 3 - 2016

Handtekening 



[1]

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.

- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

In recent years in the national Agri&Food Top sector programme [REDACTED] a number of studies have been performed to examine the effects of diet composition on intestinal integrity, mucosal immunity in the intestinal tract, the interaction between intestinal microbiome and immune parameters, and on systemic innate and specific immunity in pigs and poultry. The results of this research will be used to increase the immune competence of farm animals and to reduce the susceptibility to infectious diseases through improved nutrition.

Up to now, the focus of the research was put on effects of diet composition on the intestinal tissues and on some aspects of systemic immunity in chicken and pigs. Increasing evidence has come up on the role of microbiota on the local and also systemic immune system. It has been shown, that the composition of the intestinal bacterial microbiome is strongly influencing the immune system in the gut. [REDACTED] in piglets and broilers that the intestinal microbiome can already be influenced in early life by diet composition and inclusion of specific feed components or antimicrobials (1,2).

These effects have primarily been shown on the basis of changes in the transcriptome/genome analysis in the gut wall and changes in microbiota composition in various segments of the intestine. In pigs, it has been shown that the dietary supply of a high concentration zinc in the form of ZnO as model intervention during two weeks post weaning can, in the period after zinc supplementation, result in a significant increase in diversity of the microbiome composition and also change the expression of genes and pathways in the intestinal wall, which are related to cell metabolism and immune functions.

Although effects on the immune system are measurable on molecular basis, there is up to now limited experimental evidence of the relevance of these changes for an increased immune competence and a reduced disease susceptibility. From studies in laboratory animals it emerged that the gut microbiome indirectly via metabolites can have an impact on inflammatory reactions and disease susceptibility in the lung (3,4,5, 6). Next to such distant effects, from intestine to the lungs, it has also been shown that the local microbiome on other mucosal surfaces such as lung or vagina can interact with the local immune system.

Infectious diseases are a major health threat in pigs and veal calves and pneumoniae belong to the most important diseases in young animals due to infections. Pneumonia belongs also to the most relevant causes for the use of antibiotics. The susceptibility to develop disease is strongly related to the resistance of the animal and influenced by the immune competence of the animal. Therefore, current research efforts are focussed on increasing the resistance of animals to disease, among others by dietary interventions and modification of the intestinal microbiome. If these concepts are successful, it would offer chances to reduce lung diseases by specific feeding strategies in pigs and calves.

3.2 Purpose

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

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

In this project we want to examine the effect of feeding strategies on the innate immunity in the lungs, on the lung microbiome in calves and pigs and the susceptibility to bacterial induced pneumonia in pigs.

In the recent decennia feeding of veal calves has changed from milk feeding to artificial milk (milk replacers) fully based on plant products. The choice to alter the milk composition is mainly due to economic reasons, because plant proteins are generally much cheaper as dietary protein sources. However, cow's milk is the original diet of calves and milk also contains other bio-functional components, which may be relevant for infection and disease resistance of calves (6). The specific objective within the project is to compare the effects of milk feeding vs artificial milk based on plant products on the systemic and local innate immunity and the microbiome composition in the lungs.

In recent studies in piglets in the framework of the project it has been shown that the addition of high doses of zinc as ZnO to the diet results in changes in the intestinal microbiome. These changes in the intestinal bacterial composition is considered to have induced changes in the mRNA expression of immune related genes in intestinal tissues. The specific objective within the project is to evaluate in experimental conditions the effects of changes of microbiota composition in the immediate post-weaning period on specific immune responses and disease susceptibility. In line with earlier studies microbiota changes will be achieved by high zinc intervention via the diet. In two experimental challenge models the effects on local immunity in the gut and on innate immunity in the lungs and on disease susceptibility will be assessed. The local immune response will be addressed by measuring the serological response after vaccination with an [REDACTED]. The effects on innate immunity in the lungs and disease susceptibility for lung pathogens will be measured by examining the effects on lung cell phenotypes and on occurrence of respiratory disease signs after experimental infection with defined lung pathogens.

3.3 Relevance

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

Up to now, in the programme F4F, the impact of feeding on the immune system has been focussed on the intestinal tract and on systemic immune cells. The relevance of pneumonia in young farm animals urges this project to extend the search for immune interference to other organ systems like the lungs. There is an urgent need to provide evidence on the relationship between observed changes in immune parameters due to specific feeding strategies and the actual prevention of disease. In regard to scientific relevance, this project will provide new insights in the relationship between diet composition, the intestinal tissue development and functioning in regard to antigen processing and immunity, and the intestinal microbiome with the lung by specifically addressing parameters of innate immunity components in the lung (alveolar cell phenotyping and function) and the microbial population in the lung, including respiratory pathogens.

Due to the relevance of lung diseases in young farm animals with a high impact on the use of antibiotics and also a high impact on the welfare of the animals new strategies for the prevention of disease are urgently required.

3.4 Research strategy

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

The effect of diet composition on lung health and immunity will be examined in pigs and calves. In both species lung diseases belong to the most prevalent diseases in young animals. However, due to their different physiology the effects of specific feeds need to be addressed in both species separately.

In pigs the focus is on testing the effects of changes in the microbiome in the intestines on lung innate immunity and lung health. A second objective is to corroborate the earlier data on increased immune parameters in the intestinal wall by studying the immune response after oral vaccination. The change of the microbiome will be introduced by a feed additive, here zinc. This change of the microbiome has already been shown in earlier studies to exert effects on immunity related parameters in the intestinal wall. Effects on the immune system of the lung will be tested by comparing the composition of immune cells in the lung and the susceptibility to develop disease after experimental exposition to an aerosol with a mild virulent lung pathogen, *Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 2*. This model has been used several times and enables to discriminate effects of feeding or management treatments on the development of disease (7).

In calves two contrasting feed strategies, i.e. feeding with milk based on whey versus feeding with milk based on plant products will be compared in the first 8 weeks of life. Special attention will be paid to the effects on alveolar cells in the lung in the course of the application of the dietary treatments. Simultaneously, a performance study with veal calves using the same dietary treatments, outside this project request, will be performed under farm conditions. In this study, health observations, medical treatments during the growing period and lung findings at slaughterhouse will be used to compare the effects on general and specific lung health.

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

Pig study: In this study the effects of two treatments, i.e. low and high dose of zinc in the diet during 14 days after weaning will be studied from 18 days post weaning onwards.

In one cohort of animals from both treatment groups the immune competence in the intestinal tract will be compared on the basis of the immunological reactions after repeated vaccination with a [REDACTED] pig vaccine.

Another cohort from both treatment groups will be used to compare disease susceptibility after administration of a mild-virulent pig lung pathogen, *Actinobacillus pleuropneumoniae*. For this purpose, the latter cohort of pigs will be transferred from the feed research farm to the specialized experimental facilities, where infectious disease studies can be performed. There, the pigs will be exposed to an aerosol containing the pathogens and followed by clinical observations, body temperature measurements and pathological examination at three days after challenge inoculations. It is expected that within this model, clinical signs as respiratory distress and other severe disease signs are rarely occurring, but that a temperature increase and a focal pneumonia can occur in about 50% of the animals in the low-zinc treatment group and less in the high zinc treatment group.

Calf study: In this study two milk replacers will be examined in regard to their effects on the immune system in the intestinal tissue and on the intestinal microbiome as well as on their effects on the lung innate immunity. One milk replacer contains [REDACTED], only, the other is based on [REDACTED]. Male calves will be acquired at an age of about 1 week from dairy farms in about 30 km distance from the research farm and kept in an open-air stable. Calves will receive the respective diet from their arrival onwards during two feedings daily. Milk and roughage consumption will be recorded. At two weeks, four weeks and six weeks after start of the study, bronchoalveolar lavage samples will be obtained from each calf to study the lung lavage cell composition in regard to phenotype (macrophage, lymphocyte phenotypes, TLR expression pattern) and function. At the end of the study after 7 weeks, calves will be euthanized and intestine and lungs will be analysed in regard to immune cells and genome expression of immune related gene transcripts. Microbiome and pathogen analysis of intestine and lungs will be performed on tissue samples obtained after necropsy.

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

In both studies the effects of diets on the intestinal tissue and on the lung innate immune system is examined. Although there is no direct link between the investigated diets in calves and pigs, these studies will provide information on the possible modulation of lung innate immunity and disease resistance through nutrition.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Effect of milk replacer on innate immunity of lungs and intestine in veal calves
2	Effects of intestinal microbiome modulation on intestinal immune response and lung disease resistance in piglets.
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

1: Benis N, Schokker D, Suarez-Diez M, Martins Dos Santos VA, Smidt H, Smits MA. Network analysis of temporal functionalities of the gut induced by perturbations in new-born piglets. BMC Genomics. 2015 Jul 29;16:556.

2: Schokker D, Zhang J, Vastenhouw SA, Heilig HG, Smidt H, Rebel JM, Smits MA. Long-lasting effects of early-life antibiotic treatment and routine animal handling on gut microbiota composition and immune system in pigs. PLoS One. 2015 Feb 6;10(2):e0116523.

3: Trompette, A., et al., Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. Nat Med, 2014. 20(2): p. 159-66.

4: Tracy, M., J. Cogen, and L.R. Hoffman, The pediatric microbiome and the lung. Curr Opin Pediatr, 2015. 27(3): p. 348-55.

5: Huffnagle, G.B. and R.P. Dickson, The bacterial microbiota in inflammatory lung diseases. Clin Immunol, 2015.

6: He Y, Lawlor NT, Newburg DS. Human Milk Components Modulate Toll-Like Receptor-Mediated Inflammation. Adv Nutr. 2016 Jan 15;7(1):102-11

7: Becker PM(1), van Wikselaar PG, Mul MF, Pol A, Engel B, Wijdenes JW, van der Peet-Schwering CM, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N., Actinobacillus pleuropneumoniae is impaired by the garlic volatile allyl methylsulfide (AMS) in vitro and in-feed garlic alleviates pleuropneumonia in a pig model. Vet Microbiol. 2012 Jan 27;154(3-4):316-24.

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project | Invloed van voeding op immuniteit en longgezondheid bij kalveren en varkens
- 1.2 Looptijd van het project | 2016 - 2017
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Voeding, gezondheid, kalf, big, microbiom

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- 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)
- In afgelopen jaren is veel onderzoek gedaan naar de invloed van voeding op gezondheid en immuniteit van kippen en varkens. Hierbij is aangetoond, dat veranderingen van de samenstelling van darmbacteriën door voeding op jonge leeftijd invloed heeft op immuniteitsparameter in de darmwand. De verwachting is daarom ook, dat met behulp van gerichte sturing van de darmflora de gezondheid van landbouwhuisdieren verbeterd kan worden en aandoeningen verminderd kunnen worden. Uit onderzoek in laboratoriumdieren is duidelijk geworden, dat voeding niet alleen lokaal in de darm immuniteit beïnvloed, maar dat deze effecten ook de algemene immuniteit raken en ook op andere organen zoals in de long effect kunnen hebben. Terwijl effecten op het immuunsysteem zowel lokaal als ook algemeen aangetoond zijn, is het bewijs, dat daarmee ook een verhoogde weerstand tegen infecties en de gevolgen van infecties en ziekte tot gevolg heeft, is experimenteel bij laboratorium dieren in beperkte mate en bij landbouwhuisdieren nog niet aangetoond. Luchtweegaandoeningen ten gevolge van virale of bacteriële infecties behoren tot de belangrijkste infectieziekten van jonge kalveren en varkens. In dit project wordt in twee studies, een in varkens en een in vleeskalveren onderzocht of door middel van voeding de algemene immuniteit en de weerstand specifiek in de long kan worden verbeterd. In varkens zal hiervoor een voedingswijze getest worden, die in eerdere studies heeft aangetoond, dat het immuunsysteem in de darm - waarschijnlijk door een veranderde darmflora - geprikkeld is. De verwachting is dat dit ook geldt voor de algemene immuniteit en de weerstand in de long. Een effect op de algemene immuniteit wordt hier gemeten aan de hand van een vaccinatie met een bekend vaccin, wat via het maag-darmkanaal wordt toegediend en waar de gemeten bescherming informatie over de effect op de algemene immuniteit geeft. De weerstandsverhoging in de long wordt getest door varkens bloot te stellen aan een luchtweg bacterie, wat in onze studies bij varkens tot matige klinische verschijnselen en ontsteking in de long kan leiden. De verwachting is dat met behulp van dit model een verschil tussen de geteste voedingswijzen kan worden aangetoond. Luchtweeginfecties zijn bij vleeskalveren vooral in de eerste levensweken van betekenis. De melkvoeding van jonge kalveren bestaat vooral uit kunstmelk en de voeding van kunstmelk wordt vergeleken met gewone melk. De verwachting is dat melk een direct effect op afweercellen zal uitoefenen en dat melk ook de darmflora gaat veranderen. In eerste instantie worden de effecten op afweercellen in de long in verloop van de eerste 8 levensweken getest.
- 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?
- In deze studies wordt onderzocht hoe voeding de immuniteit, infectie- en ziektegevoeligheid beïnvloed. De mogelijkheid om de weerbaarheid tegen longziektes bij jonge dieren door voedingsmaatregelen te verhogen zou een belangrijke stap zijn om de gezondheid van jonge kalveren en biggen te verhogen en antibioticumbehandelingen te verminderen.
- 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?
- In deze studies worden 100 varkens en 36 kalveren gebruikt.
- 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn
- De varkens zullen ongerief ervaren door herhaaldelijk nemen van bloed- en fecesmonsters. De experimentele luchtweginfectie zal tot matige klinische gevolgen zoals kortdurend koorts en in uitzonderlijke gevallen tot algemene ziekte kunnen leiden. In ca. 50% van de dieren kunnen kleine haarden met longontsteking optreden. De kalveren zullen ongerief door het herhaaldelijk

van de proefdieren?	nemen van bloedmonsters en het uitvoeren van longspoelingen om afweercellen uit de long te kunnen onderzoeken.
3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Matig ongerief
3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Alle dieren in deze studies worden aan het einde van de onderzoeksperiode geëuthanaseerd om weefselmonsters van het darm- en longstelsel te verkrijgen voor verdere analyses. Dit is belangrijk om de invloed van de te onderzoeken voedingswijzen op de darmwand en het longweefsel te onderzoeken.

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.	Een samenhang tussen voeding en immuniteit of vermindering van ziektegevoeligheid in de luchtwegen kan alleen in het dier worden onderzocht. Immers zal hier het samenspel tussen voeding, samenstelling van de darmflora en de immuniteit van het dier worden onderzocht. Alternatieven in de vorm van celcultuuronderzoek, waarbij effecten van onderdelen van de onderzochte voedingscomponenten worden onderzocht zullen geen informatie op de effecten op de immuniteit opleveren.
4.2 Vermindering Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Het aantal gebruikte dieren is erop gebaseerd de verwachte effecten van de voedingen op de longafweer en gevoeligheid voor infectie, respectievelijk ziekte statistisch aan te kunnen tonen.
4.3 Verfijning Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diertype model(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de	De studies worden in diersoorten en op een leeftijd uitgevoerd (varkens in de periode na spenen en kalveren in de eerste levensweken) die ook in de gangbare praktijk de meeste luchtwegproblemen ervaren. Het gebruikte infectiemodel in varkens is gekozen, omdat het in eerdere studies mogelijk was de effecten van specifieke voeding of huisvestingsmaatregelen aan te tonen.

doelstellingen van het project.

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

Om de kalveren in de eerste levensweken zo goed mogelijk te huisvesten worden deze in een openluchtstal met strobedding gehouden. Wij verwachten hiermee omstandigheden te creëren om de algemene gezondheid zo goed mogelijk te borgen.

De varkens zullen tijdens de voedingsperiode in een stalruimte onder praktijkomstandigheden worden gehuisvest.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting DLO	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		1	Effect of milk replacer on innate immunity of lungs and intestine in veal calves

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

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In this study the effects of the composition of milk replacers based on [redacted] products on the microbiome diversity in the gut and the lung and on the local intestinal and lung immune system of veal calves will be examined. Young calves will receive the diets for a period of 7 weeks. Calves are raised in farm conditions and are therefore exposed to the common bacterial flora and viruses. Due to the fact that calves are originating from different farms and not kept in a bio-secured facility, they are also much likely exposed to infectious pathogens like bacteria, mycoplasma and viruses.

- In the course of the in-life phase of study primary read outs are effects on
- broncho-alveolar lung lavage cells in regards to the composition of cells , phenotypic characteristics of lung macrophages and functional tests of macrophages will be performed. Macrophages are the major cell type in the broncho-alveolar lavage and are an important part of the innate immune system in the lung alveoli, due to their phagocytic capacity and their role in recognition of foreign antigens.
 - blood leucocytes (WBC count, phenotypic characteristics) will be examined as part of the innate immune system,
 - presence of respiratory pathogens in lung lavage and nasal swabs as indicator of changed resistance to pathogens
 - occurrence of clinical signs of disease due to natural infections as direct parameter for infection and disease resistance.

- At the end of the study the calves will be euthanized and samples taken from the intestinal and respiratory tract to:
- Analyse the microbiome in intestine and lung to determine the effects of the different milk replacers and to demonstrate an effect of diet on the microbiome of the gut and also of the lungs
 - Analyse gut and lung tissue in regard to immune cells and immunity related mRNA.

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

Young calves will be bought in the first week of life from dairy farms in a ca. 30 km radius around the research farm, where the study will take place. Based

on arrival animals will be allocated to treatment group 1 or treatment group 2. After arrival the dietary treatment will immediately start. Calves will receive the milk replacer from buckets to individually record milk consumption. In the course of the study blood samples and broncho-alveolar lavage (BALF) samples will be taken after arrival (except BALF), at two weeks, four weeks and 6 weeks of the study. To obtain broncho-alveolar lavage catheters will be inserted into the lungs without visual control, i.e. a catheter is progressed through the nasal cavity and the upper respiratory tract into the lungs. Lavage fluid will be inserted and retracted via the catheter. During the study health observations will be recorded with special attention to clinical signs of respiratory and intestinal disease.

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

Currently there is no basic information is available on the effects of dietary ingredient composition on lung health parameters or innate immune parameters in the lungs. We assume that with 16 animals in each group we will have sufficient data to be able to draw conclusions of the effects of the dietary treatments on clinical findings and cell composition in the BALF. With this number of animals we will be able to demonstrate a difference in occurrence of clinical signs of 33% between both groups and a change in the cell numbers/composition in the lungs of about 20% ($p = 0.05$, 80% power).

B. The animals

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

A maximum of 36 male calves will be supplied at ca. one week of age. This is earlier than the regular age of calves, when they are usually transported from dairy farm to commercial veal calf productions. However, we consider that it is important to have the calves in a good condition as early as possible and this can be better achieved under the conditions at the research farm. Special attention will be paid to stimulate the supplying farms to provide the calves as early as possible with a sufficient amount of colostrum. This will after arrival be checked in blood samples based on Ig concentrations. In both treatment groups 16 calves will be used, the remaining four calves will only be supplied and used if calves have to be substituted due to clinical problems in the first week of the study. The use of male calves is due to the fact that veal calves are generally bull calves.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

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

To study the effects of specific diets, here milk replacers, on health and immune system it is inevitable to use the target animal species for this purpose. In-

in vitro systems will give very limited information on direct effects on specific cells, but so far it is not possible to study the complex interaction between diet, microbiome and host outside an animal. The experiment will be performed with a limited number of calves, which is expected to be necessary to demonstrate effects of the treatment. Although a statistical approach cannot be supported by previous experiences, the number of calves was limited to 16 per treatment group and we consider the effect size as the minimum we would like to achieve. In contrast to conventional housing of veal calves the housing conditions are enriched by keeping the calves on straw bedding and in an open-air stable system.

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

The suffering of the calves is restricted to the sample moments for obtaining blood and performing lung lavage. Due to the regular individual milk supply two times a day, calves get used to the care takers and will probably experience less stress during sampling.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Based on a recent literature review, no comparable experiments have been performed.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

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

It is not expected that the housing and care have adverse effects on the calf welfare.

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

X Yes > Describe this establishment.

Calves are kept on a research farm under farm conditons and in accordance with the "Wet Dieren". In this specific study calves are kept individually in an open-house barn in pens with straw bedding.

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

The study will be performed on a [REDACTED] farm with broad experience on raising veal calves and taking care of young calves. In addition to the regular raising of veal calves, in this study calves are housed in an open barn with optimal ventilation, which reduces the risks of respiratory problems.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

Yes

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Calves will experience stress due to the restraint during blood sampling and BALF sampling.

Explain why these effects may emerge.

Blood and bronchoalveolar lavage cannot be performed without restraining the animals. Although the calves are used to human-animal interaction, it is expected that restraining will induce a certain amount of stress. This is probably higher during lung lavage, but in our experience calves tolerate the procedure well.

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

Calves will be accustomed to be handled by care takers

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Calves are susceptible to infectious diseases and infections can result in general inflammation, diarrhea, pneumonia or sepsis. In the case that calves express clinical disease a veterinary examination will occur and if on the basis of good veterinary practice required calves will be euthanized.

Indicate the likely incidence.

According to field observations up to ca. 5%

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

Moderate

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

At the end of the experiment organ tissues from the respiratory tract and the intestine are collected for histological, genomic and microbiological investigations.

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

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

X Yes

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 40100
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--|
| 2 | Effects of intestinal microbiome modulation on intestinal immune response and lung disease resistance in piglets |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In earlier experiments it has been shown that dietary supply of a high dose of Zn as ZnO in the post weaning period results in a higher diversity of the microbiome in the small intestine in the period after zinc supplementation. Most likely due to the change in microbiome changes of several immune parameters in the intestinal tissue occur. In this study the actual effects of feed induced changes in the microbiome on the local immune system in gut and lung as well as the effect on resistance towards an infection challenge will be investigated. The study will be performed in first instance in one barn on a feed research farm.

Pigs will be allocated to two groups, one of which will receive a low dose zinc dose and the other a high zinc dose as feed additive to modify the intestinal microbiome. In this study pigs will receive the zinc treatment for a period of 14 days after weaning, then effects on the immune system or disease susceptibility will be evaluated in the subsequent period. Note, in this study zinc is only used as modifier of the microbiome and the effects of a changed microbiome are addressed.

One cohort (cohort 1) of both treatment groups will be vaccinated twice with a two week interval with a registered, [REDACTED]. The key parameter to demonstrate the hypothesized effects of an improved immune responsiveness is the humoral immune response after vaccination with an oral vaccine. Growth curves and daily recorded health observations will be used to measure the influence on general health, the humoral immune response after vaccination is considered to reflect an improved antigen processing in the gut wall.

Another cohort (cohort 2) will be transported to the experimental facilities, where infection studies can be performed. There, the pigs will be experimentally exposed to *Actinobacillus pleuropneumoniae*, a known respiratory pathogen in pigs. The challenge will be performed by the use of an aerosol one day after arrival. It was deliberately decided to challenge the pigs without a longer acclimatization period to prevent changes in the immune reaction due to the changed housing conditions in the experimental facilities. The key parameters to demonstrate the hypothesized effects of an improved immune system, a

better performance and a reduced disease susceptibility are a reduced inflammatory response, i.e. less affected lungs and a reduced bacterial load in the lungs after challenge infection. A reduction of disease susceptibility in the lung indicates an effect of the feed intervention on the innate immune system in the lungs.

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

Pigs will be kept in one barn and allocated to the two treatment groups, high zinc supply versus low zinc supply. In the period during dietary zinc administration, i.e. in the first two weeks after weaning, body weight gain will be recorded by weighing the pigs once per week and health observations at three times per week.

Four to six days after the last zinc administration, pigs of the vaccinated cohort (cohort 1) will receive the [REDACTED] vaccine [REDACTED] orally. Blood samples will be taken before vaccination and two weeks, three weeks after vaccination. Before each vaccination and 4 and 7 days after vaccination [REDACTED] [REDACTED] will be sampled for the determination of [REDACTED]. One week after the second vaccination, pigs will be euthanized and samples will be taken from intestinal tissue, intestinal digesta and the regional lymph nodes. About 10 pigs of each of the treatment groups in this cohort will be equipped with a subcutaneous temperature transponder to measure and record body temperature before and after vaccination.

Four to six days after termination of the dietary treatments, pigs of the cohort, which will be used to study the effects on disease susceptibility (cohort 2) will be transported to the experimental infection facility. On the following day pigs will be exposed for a period of ca. 20 – 30 minutes to an aerosol containing *Actinobacillus pleuropneumoniae* bacteria. Pigs will be followed clinically for 4 days and then euthanized for pathological examination and tissue sampling. Rectal body temperatures will be recorded before challenge and at about 6 hours after challenge and twice daily on the following days. Blood samples will be taken before challenge and once daily after challenge. Before and after challenge pigs will be observed twice daily and clinical signs will be recorded with special attention to respiratory disease signs and general clinical disease signs (alertness, appetite etc.). Gross- and histopathological examinations will focus on a quantitative evaluation of lung alterations.

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

The results will either be analysed by T-test or a chi-square test depending on the type of data and based on a $p < 0.05$ and a power of 95%, resp. 80% in regard to the key parameters increase in serological titre in cohort 1 and lung pathology and relative lung weights in cohort 2 (Becker et al. 2012)

B. The animals

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

A maximum of 100 pigs, male/female, four weeks at the start of the study. For each treatment (high versus low zinc) in cohort 1 (vaccine study) 32 pigs will be used and in cohort 2 16 pigs will be used. Numbers of animals in cohort 2 are based on experiences with previous studies (7), the necessary number of animals in cohort 1 is not to determine, due to limited data on seroconversion and necessary corrections for genetic relationship and pen. Therefore a total of 96 pigs will be involved in the study, 4 additional pigs will only be used if there occurs severe disease or death in the first days after weaning and piglets have to be replaced.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

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

Effects of feed on the immune system and especially on the functionality of the immune system can only be performed in the target animal. Here we want to show effects of diet composition in a near commercial production setting, therefore it is necessary to use pigs to answer the research questions. Pigs are kept in farm conditions and will receive environmental enrichment by introducing playing materials in the pens. The number of used animals is based on experiences from earlier studies with the same infection model. To reduce stress of the pigs due to repeated temperature measurement and accompanying restraining, pigs will be equipped with temperature transponders, which can be read on short distance.

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

Blood and faecal samples will be taken by experienced personal, so that the period of restraining either on the back or by a snare loop will be as short as possible.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

In a number of studies effects on the immune system have been demonstrated, but only a few studies show the effect on the function of the immune system by reduction of disease susceptibility. Literature review did not result in comparable study results.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

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

During the feeding phase of study pigs are kept on a [REDACTED] with conditions in agreement with the "Wet dieren, AMbV Besluit houders van dieren". For the aerosol infection (cohort 2) pigs are transferred to a facility, which is in accordance with Annex III.

G. Location where the animals procedures are performed

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

X No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

On the research farm pigs are kept according to practise conditions on partially slatted floors.

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

On the research farm pigs are kept according to practise conditions to measure representative growth and feed conversion.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

In cohort 1 no pain is expected. In cohort 2 pain may arise after infection with the lung pathogen. The effects of the lung infection are a critical read out of the experiment and any pain treatment could mask the effect.

Yes

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

- In both cohorts, restrain of the animals for blood sampling induces stress
- In cohort 2 the aerosol infection with *A. pleuropneumoniae* serotype 2 can result in a local pneumonia

Explain why these effects may emerge.

- In several infection experiments with the aerosol infection model with *A. pleuropneumoniae* we observed an increase in body temperature at about 6 hours after challenge in nearly all pigs. This is most probably due to endotoxins from the inoculum and induce a general, short lasting (ca. 6 hours) malaise of the pigs. Although it is expected that about 50% of the pigs will develop local pneumoniae after challenge, we only have seen signs of respiratory disease (enforced breathing, coughing) in less than 5% of the pigs. Affected pigs can develop febrile body temperatures.

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

Pigs will be observed twice daily for the occurrence of disease signs to be able to identify humane endpoints as soon as possible.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

In cohort 1 no specific humane endpoints are expected.

In cohort 2 the following humane endpoints will be applied after challenge infection:

- Severe respiratory signs with severe enforced breathing
- Body temperatures > 41°C for two consecutive measurements (twice daily observations), combined with a reduced feed and water intake

Indicate the likely incidence.

Less than 10%

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

Moderate

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

In cohort 1 pigs will be euthanized to sample intestinal tissue and intestinal content for further genome analysis.

In cohort 2 pigs will be euthanized for gross- and histopathological, microbiological and transcriptomic examination of lungs.

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

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

X Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stg DLO

Postbus 59
6700 AB WAGENINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD401002016416

Bijlagen

2

Datum 1 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 29 februari 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD401002016416. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

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: 1 juni 2017
Titel project: Effects of nutrition on lung and systemic immunity and disease susceptibility
Titel niet-technische samenvatting: Invloed van voeding of immuniteit en longgezondheid bij kalveren en varkens
Naam DEC: DEC Wageningen UR
Postadres DEC: Droevendaalsesteeg 4 6708 PB Wageningen
E-mailadres DEC: DEC@wur.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1187,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

Wageningen

Datum:

1 maart 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

**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
AVD401002016416
Bijlagen
2

Datum 1 maart 2016
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 1 maart 2016
Vervaldatum: 31 maart 2016
Factuurnummer: 16700416
Ordernummer: WUR939832

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD401002016416	€

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS0569996317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



[REDACTED]
Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Dierexperimenten
Commissie WUR

DATUM
12 april 2016

ONDERWERP
aanvraag projectvergunning
AVD401002016416

ONS KENMERK
AVD401002016416

POSTADRES
[REDACTED]

BEZOEKADRES
[REDACTED]

INTERNET
www.wageningenUR.nl

KVK NUMMER
09098104

CONTACTPERSOON
[REDACTED]

TELEFOON
[REDACTED]

E-MAIL
DEC@wur.nl

Geachte CCD,

Onderstaand het advies dat de DEC-WUR heeft gegeven aangaande het project
"Effect of nutrition on lung immunity and disease susceptibility"

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD401002016416**
2. Titel van het project: Effect of nutrition on lung immunity and disease susceptibility
3. Titel van de NTS: Invloed van voeding op immuniteit en longgezondheid bij kalveren en varkens
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag
5. Contactgegevens DEC:
DEC-WUR
[REDACTED]
Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 02-03-2016
Aanvraag compleet: 02-03-2016
In vergadering besproken: 21-03-2016
7. Correspondentie met de aanvrager
Datum vragen: 23-03-2016
Strekking van de vragen:
 - Acclimatisatie moet vermeld worden.
 - Proefopzet:
 - o Waarom is gekozen voor deze proefopzet?
 - o Uniformiteit van de proefgroepen: de DEC kan niet inschatten of de proefgroepen zich uniform zullen ontwikkelen. Er zijn te veel onzekerheden die een betrouwbare uitspraak over de resultaten in de weg kunnen staan.
 - o Moet een niet gevaccineerde controlegroep toegevoegd worden aan het experiment,
 - Op welke parameters is het aantal dieren gebaseerd?
 - Tekstuele aanpassingen
 - De DEC heeft vragen gesteld over:
 - o Ongerief: transport ontbreekt en mate van ongerief kan opgesplitst worden.
 - o Het werkingsmechanisme van ZnO op de darmfunctie.Datum antwoorden: 29-03-2016

Strekking van de antwoorden:

- In het project is opgenomen dat de dieren een acclimatisatieperiode krijgen.
- Proefopzet:
 - De opzet moet leiden tot een evenredige verdeling van kalveren van beide groepen over de stal heen met een vergelijkbare expositie aan bacteriën/virussen uit de omgeving.
 - Verder is een gecontroleerde infectie in deze fase van het onderzoek niet van belang; het gaat om het effect van voeding op de innate immuniteit in de longen.
 - Omdat het verschil tussen behandelingen belangrijker is dan het verschil tussen behandeld en niet behandeld binnen een behandelgroep wordt niet gekozen voor een ongevaccineerde controlegroep
- Primaire uitleesparameter is een verschil van 20% in de samenstelling van longcellen.
- De suggesties voor tekstuele aanpassingen zijn overgenomen.
- op vragen van de DEC:
 - transport toegevoegd bij ongerief en de dieren zijn opgesplitst in MvO.
 - ZnO verandert het microbioom en de verwachting is dat deze verandering ook lang nadat de ZnO-toediening is gestaakt aanwezig blijft. ZnO wordt in het project gebruikt als een middel om de antibiotica te modificeren.

Datum aanvullende vragen: 04-04-2016

Strekking van de aanvullende vragen:

- Waar richt het onderzoek zich op?
- Verduidelijken wat met "praktijk relevant antwoord" wordt bedoeld.
- Wat wordt bedoeld met "verschil van 20% in samenstelling van longcellen"?
- De DEC heeft aanvullende vragen gesteld over:
 - De variabiliteit tussen dieren
 - Borgen van gelijke expositie tussen groepen
 - Onduidelijkheid over de controlegroepen

Datum aanvullende antwoorden: 06-04-2016

Strekking van de aanvullende antwoorden:

- Het onderzoek richt zich op de effecten van specifieke voeding op de innate immuniteit in de longen en op het microbioom in de darmen en luchtwegen van kalveren
- De opmerking "praktijk relevant" richt zich op het feit dat de dieren in een omgeving gehuisvest worden zoals die in de praktijk voorkomt.
- Hiermee wordt 20% verschil in de genotypische kwantificering van macrofagen in de BALF bedoeld.
- Op de aanvullende vragen van de DEC:
 - Kalveren worden bij voorkeur 2-4 dagen na de geboorte aangevoerd zodat ze enerzijds voldoende colostrum hebben opgenomen en anderzijds zo min mogelijk aan evt. pathogenen zijn blootgesteld. Ook worden inclusiecriteria gehanteerd die variabiliteit moet beperken.
 - Door de kalveren van beide behandelingen om en om te huisvesten wordt een zo gelijk mogelijke expositie verkregen.
 - Hoewel er geen expliciete controlegroep is opgenomen in het experimenten dienen de dieren uit cohort 1 als controlegroep voor cohort 2.

De antwoorden hebben wederom geleid tot aanpassing van de aanvraag.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

DATUM
12 april 2016ONS KENMERK
AVD401002016416PAGINA
3 van 4**C. Beoordeling (inhoud)**

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord is.
2. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.
3. De DEC is van mening dat het directe doel een reëel belang dient: het directe doel van het project (meer inzicht krijgen in het mechanisme) heeft in de ogen van de DEC een hoge haalbaarheid. Voor het behalen van het uiteindelijke doel, dat een substantieel belang dient (een betere diergezondheid), is nog veel onderzoek nodig en de DEC kan lastig inschatten wat de haalbaarheid is van dit uiteindelijke doel.
4. Er is sprake van de volgende bijzonderheid op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: De dieren worden (binnen één dierruimte) individueel gehuisvest omdat bij de jonge kalveren dan beter de melkopname gemonitord kan worden en de hygiëne beter te handhaven is.
5. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "light" en voor een deel van dieren als "moderate" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit regelmatig nemen van bloed- en mestmonsters, ziekteverschijnselen van een longontsteking en voor wat de betreft de kalveren het ondergaan van longspoelingen.
6. De DEC heeft vastgesteld dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Een samenhang tussen voeding, microbiom en immuniteit is niet d.m.v. andere technieken te onderzoeken
7. De DEC heeft vastgesteld dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Op basis van statistische onderbouwing wordt een minimum aantal dieren ingezet. De aanvrager beschikt over voldoende expertise om te voorkomen dat eerder gedaan onderzoek herhaald wordt.
8. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De onderzoeker heeft aangegeven dat verfijning optreedt doordat de dieren gewend zijn aan de biotechnici en dat het kennen van de biotechnici mogelijk stress reduceert tijdens de monsternames. De DEC kan zich echter ook voorstellen dat de dieren de verzorgers gaan associëren met de stressvolle handelingen en dus ook stress kunnen ondervinden op het moment dat de verzorger enkel aanwezig is voor de dagelijkse verzorging. De DEC is hierover met de onderzoeker in discussie geweest waarbij de DEC aangaf dat in de literatuur bij ratten bekend is dat onvoorspelbaar afwisselen van positieve en negatieve ervaringen het welzijn niet verhogen. De onderzoeker heeft aangegeven dat het gaat om 4 potentieel negatieve ervaringsmomenten binnen 7 weken en dat dit niet als onvoorspelbaar afwisselende ervaringen gezien kan worden. Om verdere misvattingen te voorkomen heeft de onderzoeker ervoor gekozen om de zin uit het project te schrappen. De DEC is overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
9. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
10. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7.

DATUM
12 april 2016

ONS KENMERK
AVD401002016416

PAGINA
4 van 4

D. Ethische afweging

- De DEC is in consensus van mening dat het doel en de haalbaarheid van het project het gebruik van proefdieren en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan rechtvaardigt. Dit project kan een bijdrage leveren aan het begrijpen van het mechanisme en de samenhang tussen voeding, microflora en (long)immunitet.
- De DEC heeft opgemerkt dat in het project ZnO gebruikt wordt. Dit is zeer schadelijk voor het milieu. Hoewel ZnO in dit project enkel en alleen gebruikt wordt als interventiemiddel om een veranderd microbiom te verkrijgen kan de DEC zich voorstellen dat men het middel in de praktijk wil gaan toepassen wanneer blijkt dat dit werkzaam is. Momenteel wordt ZnO reeds in meerdere Europese landen toegepast. Dit baart de DEC zorgen en zij vindt dit niet gewenst. De DEC heeft dit in haar oordeel meegenomen, maar is van mening dat het in dit stadium nog geen reden is om geen vergunning te verlenen aan het onderzoek.
- De uitvoering is verder niet in strijd met andere ethische overwegingen m.b.t. het gebruik van proefdieren.

E. Advies

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

Met vriendelijke groet,

A large black rectangular redaction box covers the signature and name of the official. A small blue mark is visible at the bottom left corner of the redacted area.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting DLO

Postbus 59
6700 AB Wageningen

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002016416

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
1

Datum 15 april 2016

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 29 februari 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Effects of nutrition on lung and systemic immunity and disease susceptibility" met aanvraagnummer AVD401002016416. 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:

Niet technische samenvatting

De Niet technische samenvatting bij uw aanvraag bevat enkele tikfouten, zoals bijvoorbeeld in 3.1: 5^e regel van boven beïnvloedt; een bekend vaccin; immuniteitsparameters; **dehet** effect op algemene immuniteit en in 3.2: beïnvloedt). U wordt geadviseerd de NTS na te lopen op taalfouten. U kunt binnen veertien dagen een nieuwe Niet technische samenvatting sturen. Indien uw aanvraag wordt toegewezen zal de nieuwe Niet technische samenvatting op onze website geplaatst worden, of de bij uw aanvraag ingestuurde versie indien u geen nieuwe Niet technische samenvatting stuurt.

Onduidelijkheden in projectvoorstel

1) De varkens van cohort 2 worden tijdens het experiment getransporteerd naar een faciliteit waar de infectie zal plaatsvinden. Kunt u onderbouwen waarom dit transport niet voorafgaande aan de studie gedaan kan worden, zodat nog een acclimatisatieperiode kan worden ingebouwd voor de infectie?

2) U beschrijft in bijlage 2 dat de kalveren in de eerste week na de geboorte zullen worden getransporteerd. Wij kunnen ons voorstellen dat het transporteren van kalveren op zo'n jonge leeftijd veel stress met zich meebrengt. Heeft u rekening gehouden met het feit dat deze stress op jonge leeftijd mogelijk nadelig effect op uw onderzoek kunnen hebben? Kunt u dit onderbouwen?

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

Datum

15 april 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD401002016416

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

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

1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- | | | |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager | | |
| Postcode | | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.
- | | |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer | |
|----------------|--|

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.
- | | |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |

3 Ondertekening

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

[1]

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
40100
Dienst Landbouwkundig Onderzoek
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
Effects of nutrition on lung and systemic immunity and disease susceptibility
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

- Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.
- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.

- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

In recent years in the national Agri&Food Top sector programme [redacted] a number of studies have been performed to examine the effects of diet composition on intestinal integrity, mucosal immunity in the intestinal tract, the interaction between intestinal microbiome and immune parameters, and on systemic innate and specific immunity in pigs and poultry. The results of this research will be used to increase the immune competence of farm animals and to reduce the susceptibility to infectious diseases through improved nutrition. Up to now, the focus of the research was put on effects of diet composition on the intestinal tissues and on some aspects of systemic immunity in chicken and pigs. Increasing evidence has come up on the role of microbiota on the local and also systemic immune system. It has been shown, that the composition of the intestinal bacterial microbiome is strongly influencing the immune system in the gut, [redacted] in piglets and broilers that the intestinal microbiome can already be influenced in early life by diet composition and inclusion of specific feed components or antimicrobials (1,2). These effects have primarily been shown on the basis of changes in the transcriptome/genome analysis in the gut wall and changes in microbiota composition in various segments of the intestine. In pigs, it has been shown that the dietary supply of a high concentration zinc in the form of ZnO as model intervention during two weeks post weaning can, in the period after zinc supplementation, result in a significant increase in diversity of the microbiome composition and also change the expression of genes and pathways in the intestinal wall, which are related to cell metabolism and immune functions.

Although effects on the immune system are measurable on molecular basis, there is up to now limited experimental evidence of the relevance of these changes for an increased immune competence and a reduced disease susceptibility. From studies in laboratory animals it emerged that the gut microbiome indirectly via metabolites can have an impact on inflammatory reactions and disease susceptibility in the lung (3,4,5, 6). Next to such distant effects, from intestine to the lungs, it has also been shown that the local microbiome on other mucosal surfaces such as lung or vagina can interact with the local immune system.

Infectious diseases are a major health threat in pigs and veal calves and pneumoniae belong to the most important diseases in young animals due to infections. Pneumonia belongs also to the most relevant causes for the use of antibiotics. The susceptibility to develop disease is strongly related to the resistance of the animal and influenced by the immune competence of the animal. Therefore, current research efforts are focussed on increasing the resistance of animals to disease, among others by dietary interventions and modification of the intestinal microbiome. If these concepts are successful, it would offer chances to reduce lung diseases by specific feeding strategies in pigs and calves.

3.2 Purpose

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

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

In this project we want to examine the effect of feeding strategies on the innate immunity in the lungs, on the lung microbiome in calves and pigs and the susceptibility to bacterial induced pneumonia in pigs.

In the recent decennia feeding of veal calves has changed from milk feeding to artificial milk (milk replacers) fully based on plant products. The choice to alter the milk composition is mainly due to economic reasons, because plant proteins are generally much cheaper as dietary protein sources. However, cow's milk is the original diet of calves and milk also contains other bio-functional components, which may be relevant for infection and disease resistance of calves (6). The specific objective within the project is to compare the effects of milk feeding vs artificial milk based on plant products on the systemic and local innate immunity and the microbiome composition in the lungs.

In recent studies in piglets in the framework of the project is has been shown that the addition of high doses of zinc as ZnO to the diet results in changes in the intestinal microbiome. These changes in the intestinal bacterial composition is considered to have induced changes in the mRNA expression of immune related genes in intestinal tissues. The specific objective within the project is to evaluate in experimental conditions the effects of changes of microbiota composition in the immediate post-weaning period on specific immune responses and disease susceptibility. In line with earlier studies microbiota changes will be achieved by high zinc intervention via the diet. In two experimental challenge models the effects on local immunity in the gut and on innate immunity in the lungs and on disease susceptibility will be assessed. The local immune response will be addressed by measuring the serological response after vaccination with an [REDACTED]. The effects on innate immunity in the lungs and disease susceptibility for lung pathogens will be measured by examining the effects on lung cell phenotypes and on occurrence of respiratory disease signs after experimental infection with defined lung pathogens.

3.3 Relevance

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

Up to now, in the programme F4F, the impact of feeding on the immune system has been focussed on the intestinal tract and on systemic immune cells. The relevance of pneumonia in young farm animals urges this project to extend the search for immune interference to other organ systems like the lungs. There is an urgent need to provide evidence on the relationship between observed changes in immune parameters due to specific feeding strategies and the actual prevention of disease. In regard to scientific relevance, this project will provide new insights in the relationship between diet composition, the intestinal tissue development and functioning in regard to antigen processing and immunity, and the intestinal microbiome with the lung by specifically addressing parameters of innate immunity components in the lung (alveolar cell phenotyping and function) and the microbial population in the lung, including respiratory pathogens. Due to the relevance of lung diseases in young farm animals with a high impact on the use of antibiotics and also a high impact on the welfare of the animals new strategies for the prevention of disease are urgently required.

3.4 Research strategy

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

The effect of diet composition on lung health and immunity will be examined in pigs and calves. In both species lung diseases belong to the most prevalent diseases in young animals. However, due to their different physiology the effects of specific feeds need to be addressed in both species separately.

In pigs the focus is on testing the effects of changes in the microbiome in the intestines on lung innate immunity and lung health. A second objective is to corroborate the earlier data on increased immune parameters in the intestinal wall by studying the immune response after oral vaccination. The change of the microbiome will be introduced by a feed additive, here zinc (ZnO). This change of the microbiome has already been shown in earlier studies to exert effects on immunity related parameters in the intestinal wall. Effects on the immune system of the lung will be tested by comparing the composition of immune cells in the lung and the susceptibility to develop disease after experimental exposure to an aerosol with a mild virulent lung pathogen, *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. This model has been used several times and enables to discriminate effects of feeding or management treatments on the development of disease (7).

In calves two contrasting feed strategies, i.e. feeding with milk based on whey versus feeding with milk based on plant products will be compared in the first 8 weeks of life. Special attention will be paid to the effects on alveolar cells in the lung in the course of the application of the dietary treatments. Simultaneously, a performance study with veal calves using the same dietary treatments, outside this project request, will be performed under farm conditions. In this study, health observations, medical treatments during the growing period and lung findings at slaughterhouse will be used to compare the effects on general and specific lung health.

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

Pig study: In this study the effects of two treatments, i.e. low and high dose of zinc in the diet during 14 days after weaning will be studied from 18 days post weaning onwards.

In one cohort of animals from both treatment groups the immune competence in the intestinal tract will be compared on the basis of the immunological reactions after repeated vaccination with a [redacted] pig vaccine.

Another cohort from both treatment groups will be used to compare disease susceptibility after administration of a mild-virulent pig lung pathogen, *Actinobacillus pleuropneumoniae*. For this purpose, the latter cohort of pigs will be transferred from the feed research farm to the specialized experimental facilities, where infectious disease studies can be performed. There, the pigs will be exposed to an aerosol containing the pathogens and followed by clinical observations, body temperature measurements and pathological examination at three days after challenge inoculations. It is expected that within this model, clinical signs as respiratory distress and other severe disease signs are rarely occurring, but that a temperature increase and a focal pneumonia can occur in about 50% of the animals in the low-zinc treatment group and less in the high zinc treatment group.

Calf study: In this study two milk replacers will be examined in regard to their effects on the immune system in the intestinal tissue and on the intestinal microbiome as well as on their effects on the lung innate immunity. One milk replacer contains [redacted] only, the other is based on [redacted]

Male calves will be acquired at an age of about 1 week from dairy farms in about 30 km distance from the research farm and kept in an open-air stable. Calves will receive the respective diet from their arrival onwards during two feedings daily. Milk and roughage consumption will be recorded. At two weeks, four weeks and six weeks after start of the study, bronchoalveolar lavage samples will be obtained from each calf to study the lung lavage cell composition in regard to phenotype (macrophage, lymphocyte phenotypes, TLR expression pattern) and function. At the end of the study after 7 weeks, calves will be euthanized and intestine and lungs will be analysed in regard to immune cells and genome expression of immune related gene transcripts. Microbiome and pathogen analysis of intestine and lungs will be performed on tissue samples obtained after necropsy.

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

In both studies the effects of diets on the intestinal tissue and on the lung innate immune system is examined. Although there is no direct link between the investigated diets in calves and pigs, these studies will provide information on the possible modulation of lung innate immunity and disease resistance through nutrition.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Effect of milk replacer on innate immunity of lungs and intestine in veal calves
2	Effects of intestinal microbiome modulation on intestinal immune response and lung disease resistance in piglets.
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

1: Benis N, Schokker D, Suarez-Diez M, Martins Dos Santos VA, Smidt H, Smits MA. Network analysis of temporal functionalities of the gut induced by perturbations in new-born piglets. BMC Genomics. 2015 Jul 29;16:556.

2: Schokker D, Zhang J, Vastenhouw SA, Heilig HG, Smidt H, Rebel JM, Smits MA. Long-lasting effects of early-life antibiotic treatment and routine animal handling on gut microbiota composition and immune system in pigs. PLoS One. 2015 Feb 6;10(2):e0116523.

3: Trompette, A., et al., Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. Nat Med, 2014. 20(2): p. 159-66.

4: Tracy, M., J. Cogen, and L.R. Hoffman, The pediatric microbiome and the lung. Curr Opin Pediatr, 2015. 27(3): p. 348-55.

5: Huffnagle, G.B. and R.P. Dickson, The bacterial microbiota in inflammatory lung diseases. Clin Immunol, 2015.

6: He Y, Lawlor NT, Newburg DS. Human Milk Components Modulate Toll-Like Receptor-Mediated Inflammation. Adv Nutr. 2016 Jan 15;7(1):102-11

7: Becker PM(1), van Wikselaar PG, Mul MF, Pol A, Engel B, Wijdenes JW, van der Peet-Schwering CM, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N., Actinobacillus pleuropneumoniae is impaired by the garlic volatile allyl methylsulfide (AMS) in vitro and in-feed garlic alleviates pleuropneumonia in a pig model. Vet Microbiol. 2012 Jan 27;154(3-4):316-24.

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

40100

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

Stichting DLO

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Effect of milk replacer on innate immunity of lungs and intestine in veal calves

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

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In this study the effects of the composition of milk replacers based on [REDACTED] products on the microbiome diversity in the gut and the lung and on the local intestinal and lung immune system of veal calves will be examined. Young calves will receive the diets for a period of 7 weeks. Calves are raised in farm conditions and are therefore exposed to the common bacterial flora and viruses. Due to the fact that calves are originating from different farms and not kept in a bio-secured facility, it cannot be excluded, that they are exposed to infectious pathogens like bacteria, mycoplasma and viruses. Therefore the time on farm will be limited as much as possible and calves are transferred to the research facilities within the first week of life.

In the course of the in-life phase of study primary read outs are effects on

- broncho-alveolar lung lavage cells in regards to the composition of cells , phenotypic characteristics of lung macrophages and functional tests of macrophages will be performed. Macrophages are the major cell type in the broncho-alveolar lavage and are an important part of the innate immune system in the lung alveoli, due to their phagocytic capacity and their role in recognition of foreign antigens.
- blood leucocytes (WBC count, phenotypic characteristics) will be examined as part of the innate immune system,
- presence of respiratory pathogens in lung lavage and nasal swabs as indicator of changed resistance to pathogens
- occurrence of clinical signs of disease due to natural infections as direct parameter for infection and disease resistance.

At the end of the study the calves will be euthanized and samples taken from the intestinal and respiratory tract to:

- Analyse the microbiome in intestine and lung to determine the effects of the different milk replacers and to demonstrate an effect of diet on the microbiome of the gut and also of the lungs
- Analyse gut and lung tissue in regard to immune cells and immunity related mRNA.

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

Young calves will be bought in the first week of life from dairy farms in a ca. 30 km radius around the research farm, where the study will take place. A number of farms will be selected to be able to select sufficient healthy calves. Calves will be received preferentially within 2 to 4 days after birth to assure on one hand adequate consumption of colostrum and acquisition of passive immunity and on the other hand to limit the time of exposition to pathogens on the farm of origin. If necessary the time after birth can be extended to 7 days. Specific inclusion and exclusion criteria, such as body condition, lung and intestinal health as well as being tested negative for bovine diarrhoea virus (BVDv) will be specified in the work plan. Based on arrival animals will be allocated to treatment group 1 or treatment group 2. In the barn calves are placed in such a way, that calves from treatment 1. and treatment 2 are housed in alternating way, so that both groups have comparable exposition to environmental bacterial flora. After arrival the dietary treatment will immediately start. Calves will receive the milk replacer from buckets to individually record milk consumption. In the course of the study blood samples and broncho-alveolar lavage (BALF) samples will be taken after arrival (except BALF), at two weeks, four weeks and 6 weeks of the study. To obtain broncho-alveolar lavage catheters will be inserted into the lungs without visual control, i.e. a catheter is progressed through the nasal cavity and the upper respiratory tract into the lungs. Lavage fluid will be inserted and retracted via the catheter. BALF will be transported to the laboratory and phenotypical and functional measurements on BALF cells and microbiological measurement on BALF fluid performed. During the study health observations will be recorded with special attention to clinical signs of respiratory and intestinal disease.

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

Currently there is no basic information available on the effects of dietary ingredient composition on lung health parameters or innate immune parameters in the lungs. We assume that with 16 animals in each group we will have sufficient data to be able to draw conclusions of the effects of the dietary treatments on clinical findings and cell composition in the BALF. With this number of animals we will be able to demonstrate differences with an effect size d of 1 with a power of 80% and a p -value < 0.05 . Such an effect size would e.g. enable to show a difference of BALF cell composition of 20% with an expected coefficient of variation of ca. 20%, which is observed in infection experiments with bovine respiratory syncytial virus (BRSV).

B. The animals

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

A maximum of 36 male calves will be supplied within the first week of life. This is earlier than the regular age of calves, when they are usually transported from dairy farm to commercial veal calf productions. However, we consider that it is important to have the calves in a good condition as early as possible and this can be better achieved under the conditions at the research farm. Special attention will be paid to stimulate the supplying farms to provide the calves as early as possible with a sufficient amount of colostrum. This will after arrival be checked in blood samples based on Ig concentrations. In both treatment groups 16 calves will be used, the remaining four calves will only be supplied and used if calves have to be substituted due to clinical problems in the first week of the study. The use of male calves is due to the fact that veal calves are generally bull calves.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

X No, continue with question D.

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

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

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

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

To study the effects of specific diets, here milk replacers, on health and immune system it is inevitable to use the target animal species for this purpose. In-vitro systems will give very limited information on direct effects on specific cells, but so far it is not possible to study the complex interaction between diet, microbiome and host outside an animal. The experiment will be performed with a limited number of calves, which is expected to be necessary to demonstrate effects of the treatment. Although a statistical approach cannot be supported by previous experiences, the number of calves was limited to 16 per treatment group and we consider the effect size as the minimum we would like to achieve. In contrast to conventional housing of veal calves the housing conditions are enriched by keeping the calves on straw bedding and in an open-air stable system.

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

The suffering of the calves is restricted to the sample moments for obtaining blood and performing lung lavage. Only experienced personnel will perform this sampling. No adverse effects on the environment are expected.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Based on a recent literature review, no comparable experiments have been performed.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

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

Calves are kept on a research farm under farm conditions and in accordance with the "Wet Dieren". In this specific study calves are kept individually in an open-house barn in pens with straw bedding. It is not expected that the housing and care have adverse effects on the calf welfare.

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

X Yes > Describe this establishment.

Calves are kept on a [redacted] farm under farm conditions and in accordance with the "Wet Dieren". In this specific study calves are kept individually in an open-house barn in pens with straw bedding.

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

The study will be performed on a [redacted] farm with broad experience on raising veal calves and taking care of young calves. In addition to the regular raising of veal calves, in this study calves are housed in an open barn with optimal ventilation, which reduces the risks of respiratory problems.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

X No > Continue with question I.

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

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

Yes

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Calves will be transported in their first week of life. Calves will experience stress due to the restraint during blood sampling and BALF sampling.

Explain why these effects may emerge.

By choosing farms within a diameter of 30 km around the research facilities, the transport distance and time is limited, but transport in itself will induce stress to the animals. Blood and bronchoalveolar lavage cannot be performed without restraining the animals. Although the calves are used to human-animal interaction, it is expected that restraining will induce a certain amount of stress. This is probably higher during lung lavage, but in our experience calves tolerate the procedure well.

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

Calves will be accustomed to be handled by care takers

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Calves are susceptible to infectious diseases and infections can result in general illness, diarrhea, pneumonia or sepsis. In the case that calves express clinical disease a veterinary examination will occur and if on the basis of good veterinary practice required calves will be euthanized.

Indicate the likely incidence.

According to field observations up to ca. 5%

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe):

Moderate

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

At the end of the experiment organ tissues from the respiratory tract and the intestine are collected for histological, genomic and microbiological investigations.

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

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

X Yes

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

40100

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
2	Effects of intestinal microbiome modulation on intestinal immune response and lung disease resistance in piglets

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

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In earlier experiments it has been shown that dietary supply of a high dose of Zn as ZnO in the post weaning period results in a higher diversity of the microbiome in the small intestine in the period after zinc supplementation. Most likely due to the change in microbiome changes of several immune parameters in the intestinal tissue occur. In earlier studies effects on the intestinal epithelium have been shown by molecular analyses, but not yet on a functional basis. Molecular changes in the jejunum and ileum mucosa were altered gene expressions related to absorption of minerals, cell metabolism and immune parameters. In this study the actual effects of feed induced changes in the microbiome on the local immune system in gut and lung as well as the effect on resistance towards an infection challenge will be investigated. The study will be performed in first instance in one barn on a feed research farm. For clarification please note, that the use of ZnO is a model intervention and the study is not directed towards the effects of ZnO, but towards the effects of the microbiome, which is modified by an intervention like ZnO.

Pigs will be allocated to two groups, one of which will receive a low dose zinc dose and the other a high zinc dose as feed additive to modify the intestinal microbiome. In this study pigs will receive the zinc treatment for a period of 14 days after weaning, then effects on the immune system or disease susceptibility will be evaluated in the subsequent period. Note, in this study zinc is only used as modifier of the microbiome and the effects of a changed microbiome are addressed.

One cohort (cohort 1) of both treatment groups will be vaccinated twice with a two week interval with a registered, [REDACTED]. The key parameter to demonstrate the hypothesized effects of an improved immune responsiveness is the humoral immune response after vaccination with an oral vaccine. Growth curves and daily recorded health observations will be used to measure the influence on general health, the humoral immune response after vaccination is considered to reflect an improved antigen processing in the gut wall.

Another cohort (cohort 2) will be transported to the experimental facilities, where infection studies can be performed. There, the pigs will be experimentally

exposed to *Actinobacillus pleuropneumoniae*, a known respiratory pathogen in pigs. The challenge will be performed by the use of an aerosol one to three days after arrival. It was deliberately decided to challenge the pigs without a longer acclimatization period to prevent changes in the immune reaction due to the changed housing conditions in the experimental facilities. The key parameters to demonstrate the hypothesized effects of an improved immune system, a better performance and a reduced disease susceptibility are a reduced inflammatory response, i.e. less affected lungs and a reduced bacterial load in the lungs after challenge infection. A reduction of disease susceptibility in the lung indicates an effect of the feed intervention on the innate immune system in the lungs.

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

Pigs will be kept in one barn and allocated to the two treatment groups, high zinc supply versus low zinc supply. In the period during dietary zinc administration, i.e. in the first two weeks after weaning, body weight gain will be recorded by weighing the pigs once per week and clinical observations at three times per week.

Four to six days after the last zinc administration, pigs of the vaccinated cohort (cohort 1) will receive the vaccine orally. Blood samples will be taken before vaccination and two weeks, three weeks after vaccination. Before each vaccination and 4 and 7 days after vaccination will be sampled for the determination of [redacted]. One week after the second vaccination, pigs will be euthanized and samples will be taken from intestinal tissue, intestinal digesta and the regional lymph nodes. About 10 pigs of each of the treatment groups in this cohort will be equipped with a subcutaneous temperature transponder to measure and record body temperature before and after vaccination.

Four to six days after termination of the dietary treatments, pigs, which will be used to study the effects on disease susceptibility (cohort 2) will be transported to the experimental infection facility. On the following days pigs will be exposed once for a period of ca. 20 – 30 minutes to an aerosol containing *Actinobacillus pleuropneumoniae* bacteria. Pigs will be followed clinically for 4 days and then euthanized for pathological examination and tissue sampling. Rectal body temperatures will be recorded before challenge and at about 6 hours after challenge and twice daily on the following days. Blood samples will be taken before challenge and once daily after challenge. Before and after challenge pigs will be observed twice daily and clinical signs will be recorded with special attention to respiratory disease signs and general clinical disease signs (alertness, appetite etc.). Gross- and histopathological examinations will focus on a quantitative evaluation of lung alterations. Additionally, intestinal samples will be examined for the presence of salmonella and be used as controls for cohort 1.

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

The results will either be analysed by T-test or a chi-square test depending on the type of data and based on a $p < 0.05$ and a power of 95%, resp. 80% in regard to the key parameters increase in serological titre in cohort 1 and lung pathology and relative lung weights in cohort 2 (Becker et al. 2012)

B. The animals

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

A maximum of 100 pigs, male/female, four weeks at the start of the study. For each treatment (high versus low zinc) in cohort 1 (vaccine study) 32 pigs will be used and in cohort 2 16 pigs will be used. Numbers of animals in cohort 2 are based on experiences with previous studies (7), the necessary number of animals in cohort 1 is not to determine, due to limited data on seroconversion and necessary corrections for genetic relationship and pen. Therefore a total of 96 pigs will be involved in the study, 4 additional pigs will only be used if there occurs severe disease or death in the first days after weaning and piglets have to be replaced.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

X No. continue with question D.

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

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

X No

Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

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

Effects of feed on the immune system and especially on the functionality of the immune system can only be performed in the target animal. Here we want to show effects of diet composition in a near commercial production setting, therefore it is necessary to use pigs to answer the research questions. Pigs are kept in farm conditions and will receive environmental enrichment by introducing playing materials in the pens. The number of used animals is based on experiences from earlier studies with the same infection model. To reduce stress of the pigs due to repeated temperature measurement and accompanying restraining, pigs will be equipped with temperature transponders, which can be read on short distance.

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

- Blood and faecal samples will be taken by experienced personnel, so that the period of restraining either on the back or by a snare loop will be as short as possible.
- The use of ZnO is common in a number of EU countries, but in NL only allowed for research purposes and the use in this study approved by the Dutch Animal Feed Authorities.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

In a number of studies effects on the immune system have been demonstrated, but only a few studies show the effect on the function of the immune system by reduction of disease susceptibility. Literature review did not result in comparable study results.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

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

During the feeding phase of study pigs are kept on a [redacted] with conditions in agreement with the "Wet dieren, AMbV Besluit houders van dieren". For the aerosol infection (cohort 2) pigs are transferred to a facility, which is in accordance with Annex III.

G. Location where the animals procedures are performed

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

X No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

On the research farm pigs are kept according to practise conditions on partially slatted floors.

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

On the research farm pigs are kept according to practise conditions to measure representative growth and feed conversion.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

In cohort 1 no pain is expected. In cohort 2 pain may arise after infection with the lung pathogen. The effects of the lung infection are a critical read out of the experiment and any pain treatment could mask the effect.

Yes

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

- In both cohorts, restrain of the animals for blood sampling induces stress
- Pigs in cohort 2 will be transported over a distance of ca. 125 km from one research facility to the other
- In cohort 2 the aerosol infection with *A. pleuropneumoniae* serotype 2 can result in a local pneumonia

Explain why these effects may emerge.

- The transport of pigs in cohort 2 will induce stress;
- In several infection experiments with the aerosol infection model with *A. pleuropneumoniae* we observed an increase in body temperature at about 6 hours after challenge in nearly all pigs. This is most probably due to endotoxins from the inoculum and induce a general, short lasting (ca. 6 hours) malaise of the pigs. Although it is expected that about 50% of the pigs will develop local pneumoniae after challenge, we only have seen signs of

respiratory disease (enforced breathing, coughing) in less than 5% of the pigs. Affected pigs can develop febrile body temperatures.

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

- To reduce the expected stress consequences the pigs will be kept in the same animal groups as used to be at the research facility of origin and they will receive the same feed, which will be supplied together with the pigs.
- Pigs will be observed twice daily for the occurrence of disease signs to be able to identify humane endpoints as soon as possible.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

In cohort 1 no specific humane endpoints are expected.

In cohort 2 the following humane endpoints will be applied after challenge infection:

- Severe respiratory signs with severe enforced breathing
- Body temperatures > 41°C for two consecutive measurements (twice daily observations), combined with a reduced feed and water intake

Indicate the likely incidence.

Less than 10%

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

In cohort 1: mild

In cohort 2: moderate

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

In cohort 1 pigs will be euthanized to sample intestinal tissue and intestinal content for further genome analysis.

In cohort 2 pigs will be euthanized for gross- and histopathological, microbiological and transcriptomic examination of lungs.

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

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

X Yes

Van: DEC <dec@wur.nl>
Verzonden: woensdag 20 april 2016 13:11
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: RE: Aanvullend advies aanvraag AVD401002016416

Categorieën: Dossier: ██████████

Geachte CCD,

In de DEC is gesproken over het ondergaan van longlavages. In de gangbare praktijk gebeurt dit ook zonder sedatie of anesthesie. Ervaringen met eerdere experimenten binnen de vergunninghouder hebben uitgewezen dat het ongerief beperkt is en dat het toedienen van sedatie/anesthesie geen verfijning tot gevolg zou hebben, immers het toedienen van sedatie/anesthesie brengt ook ongerief met zich mee.

Ik hoop hiermee uw vraag vloeiende beantwoord te hebben.

Met vriendelijke groeten,

██████████

 ██████████
 ██████████, Wageningen UR
 tel: ██████████
 ██████████
 e-mail: DEC@wur.nl
 ██████████

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

From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: vrijdag 15 april 2016 11:07
To: DEC
Subject: Aanvullend advies aanvraag AVD401002016416

Beste DEC WUR,
 Enkele dagen geleden stuurde u ons een advies betreffende aanvraag AVD401002016416, getiteld: Effect of nutrition on lung immunity and disease susceptibility.
 Onze dank voor dit heldere advies.

Wij hebben nog 1 vraag specifiek gericht aan u:

Het viel ons op dat de kalveren in deze aanvraag longlavages ondergaan zonder sedatie. Wat is de mening van de DEC hierover? Zou u sedatie aanbevelen?

Daarnaast hebben wij nog enkele vragen gesteld aan de aanvrager, waarover we graag ook graag uw standpunt willen:

1) De varkens van cohort 2 worden tijdens het experiment getransporteerd naar een faciliteit waar de infectie zal plaatsvinden. Kunt u onderbouwen waarom dit transport niet voorafgaande aan de studie gedaan kan worden, zodat nog een acclimatisatieperiode kan worden ingebouwd voor de infectie?

2) U beschrijft in bijlage 2 dat de kalveren in de eerste week na de geboorte zullen worden getransporteerd. Wij kunnen ons voorstellen dat het transporteren van kalveren op zo'n jonge leeftijd veel stress met zich meebrengt. Heeft u rekening gehouden met het feit dat deze stress op jonge leeftijd mogelijk nadelig effect op uw onderzoek kunnen hebben? Kunt u dit onderbouwen?

Om er zeker van te zijn dat deze aanvraag in de eerstvolgende CCD behandeld kan worden wil ik u vragen om **uiterlijk donderdag 21 april** een antwoord op deze vragen te geven.

Met vriendelijke groet,


Centrale Commissie Dierproeven



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Sta DLO

Postbus 59
6700 AB WAGENINGEN



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002016416
Bijlagen
1

Datum 26-4-2016
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 29 februari 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Effects of nutrition on lung and systemic immunity and disease susceptibility" met aanvraagnummer AVD401002016416. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 18 april 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. De aanvulling betrof nadere uitleg over de noodzaak van transport van kalveren in de eerste week na de geboorte en transport van varkens tijdens de studie. Uw uitleg was voldoende.

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 "Effects of nutrition on lung and systemic immunity and disease susceptibility" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 mei 2016 tot en met 1 juni 2017.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. Dit advies is opgesteld op 12 april 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 20 april 2016 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. De DEC is aanvullend advies gevraagd betreffende het ongerief van longlavages bij de kalveren en of sedatie hierbij wenselijk is.

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.
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.

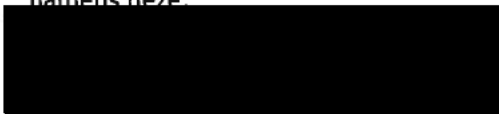
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma
plv 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: Stg DLO
Adres: Postbus 59
Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN
Deelnemersnummer: 40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 01 mei 2016 tot en met 1 juni 2017, voor het project "Effects of nutrition on lung and systemic immunity and disease susceptibility" met aanvraagnummer AVD401002016416, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Senior Onderzoeker. Voor de uitvoering van het project is [REDACTED] verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 29 februari 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per brief op 13 april 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 18 april 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 12 april 2016, ontvangen op 13 april 2016, aangevuld op 20 april 2016.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 18 april 2016

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Effect of milk replacer on innate immunity of lungs and intestine in veal calves	Runderen (Bos taurus) /	36	100% Matig	
Effects of intestinal microbiome modulation on intestinal immune response and lung disease resistance in piglets	Varkens (Sus scrofa domesticus) /	100	32% Matig 68% Licht	Er worden 4 extra biggen aangevraagd, die alleen gebruikt zullen worden als er ernstige ziekte of dood plaatsvindt in de eerste dagen na spenen, en dieren vervangen moeten worden.

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.

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).



AVD401002016417

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 40100	
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	9098104
		Straat en huisnummer	Akkermaalsbos 12
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>	Postbus	59
		Postcode en plaats	6700AB Wageningen
		IBAN	NL10RABO0397066465
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Onderzoeker
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Onderzoeker
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|----------------|
| Startdatum | 01 - 04 - 2016 |
| Einddatum | 01 - 04 - 2021 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- | |
|---|
| Immunogenicity and efficacy of innovative vaccines against respiratory diseases in pigs |
|---|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- | |
|--|
| Werkzaamheid van nieuw ontwikkelde vaccins tegen virale luchtweginfecties in varkens |
|--|
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|--|
| Naam DEC | DEC Wageningen UR |
| Postadres | Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen |
| E-mailadres | dec@wur.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1187,- 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 + 2 bijlagen
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging Mandaatbesluit [REDACTED]
- Bestelorder WUR938730

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

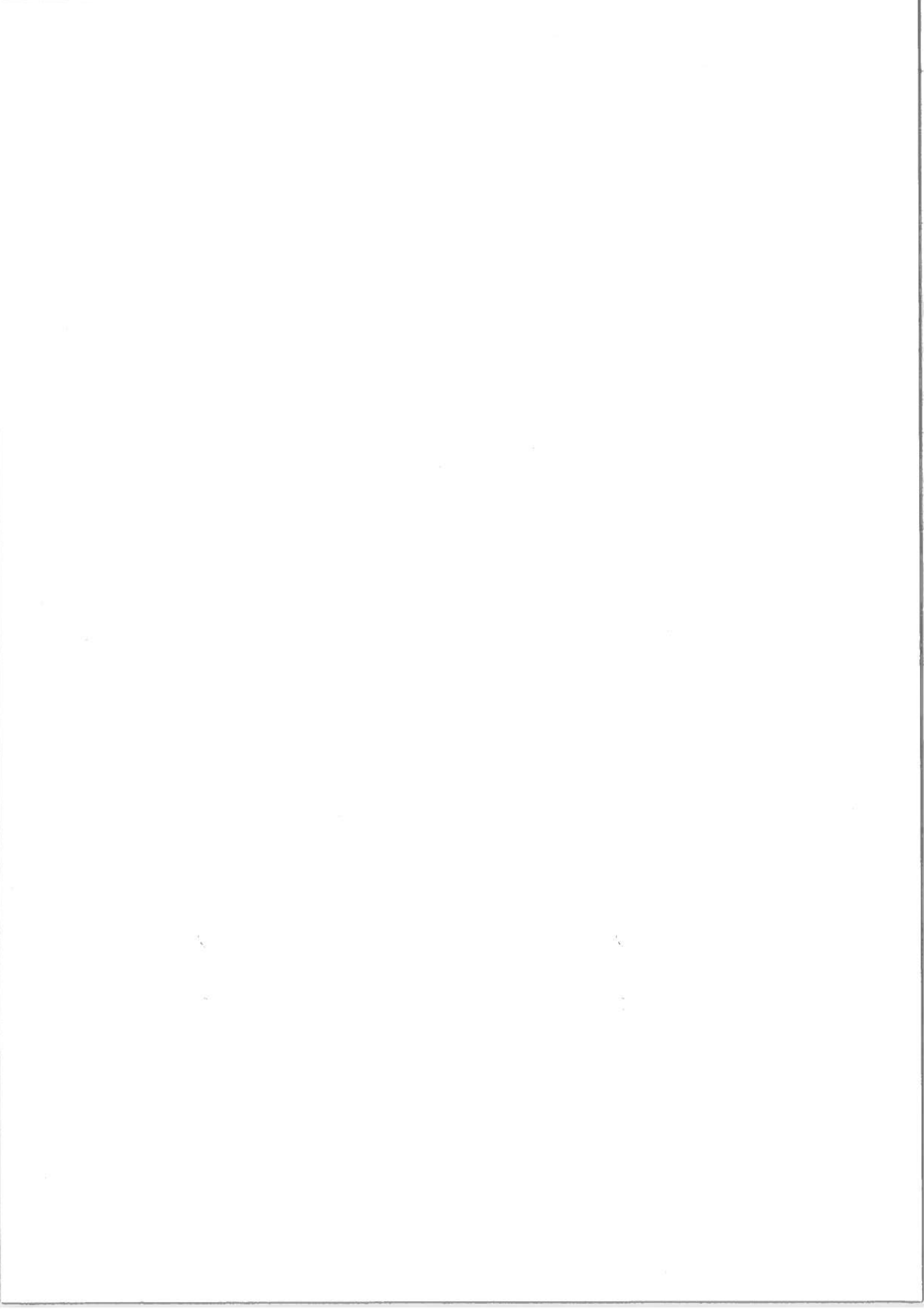
Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Wageningen

Datum 25 - 2 - 2016

Handtekening [REDACTED]





Form Project proposal

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 40100
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)
- 1.3 Provide the title of the project. Immunogenicity and efficacy of innovative vaccines against respiratory diseases in pigs

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Respiratory diseases in pigs are a major health concern in swine production (Opriessnig, 2011) The term 'porcine respiratory disease complex' (PRDC) has been widely used by pig veterinarians and producers to

describe the multifactorial disease complex characterized by respiratory symptoms and poor growth in growing and finishing pigs. PRDC is one of the most important health concerns for pig producers and can involve multiple viral and bacterial pathogens. Viruses most commonly associated with PRDC include influenza A virus, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, and porcine respiratory corona virus.

The purpose of this project is to study immunogenicity and efficacy of novel vaccine strategies against swine influenza virus and porcine circovirus type 2; two economically important pathogens of pigs and often been associated with PRDC.

Swine influenza virus (SIV) is particularly relevant, not only due to its capacity to cause disease in pigs but also due to its zoonotic potential, as evidenced by the emergence of pandemic H1N1 (2009) virus in humans (Loeffen, 2009).

Influenza in pigs resembles flu episodes in humans; high morbidity, low mortality and fast recovery are the rules (Rajao, 2014). SIV infections are usually characterized by high fever, decreased food intake, respiratory distress, coughing, sneezing, conjunctivitis and nasal discharge in pigs of all ages. The high morbidity may lead to considerable production losses in function of the reduction in food intake and weight gain.

Influenza viruses are single-stranded RNA viruses of types A, B and C, with type A causing epidemic or pandemic outbreaks in animals and man, with potential animal-to-human and human-to-animal transmission. SIVs are type A influenza viruses mostly of the subtypes H1N1, H3N2, or H1N2. A typical property of influenza A viruses is their great variability which is mainly caused by two mechanisms; genetic drift, the continuous accumulation of nucleotide substitutions over time and reassortment, the exchange of one or more gene segments (denoted as antigenic drift and antigenic shift) (Kyriakis, 2011; Watson, 2015). Effective vaccination is complicated by the tendency of influenza A viruses to undergo these gradual or rapid changes in the sequence of their hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) antigens.

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is a small, non-enveloped single-stranded circular DNA virus. Porcine circovirus type 2 (PCV2) is the primary causative agent of porcine circovirus-associated disease (PCVAD) (Segalés, 2012). The virus preferentially targets the lymphoid tissues, which leads to lymphoid depletion and immunosuppression in pigs. The disease is exacerbated by immune stimulation or concurrent infections with other pathogens. PCV2 resides in certain immune cells, such as macrophage and dendritic cells, and modulates their functions. Through the interaction with the immune system PCV2 is also a relevant player in the PRDC.

Nucleic acid-based vaccines are innovative in several ways. These vaccines combine the simplicity, safety and focused immunogenicity of subunit vaccines with favourable immunological properties of live viral vaccines. These modern vaccine concepts are considered to be used as vaccine platforms, where vaccines against different viruses can be addressed with a similar strategy. The vaccines are molecularly defined, synthetically produced and carry no excess information, but just the required information of the desired antigen. Nucleic acid-based vaccines are expected to induce balanced immune responses including B cells, helper T cells, and cytotoxic T lymphocytes and can be tailored to provide potent adjuvant stimuli to the innate immune system, which reduce the need for additional adjuvants. (Ulmer, 2015; Petsch, 2012)

References

- [1] Opriessnig T, Gimenez-Lirola LG, Halbur PG. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*. 2011;12:133-48.
- [2] Loeffen W. [Swine flu and Mexican flu: the role of the pig]. *Tijdschrift voor diergeneeskunde*. 2009;134:712-4.
- [3] Rajao DS, Anderson TK, Gauger PC, Vincent AL. Pathogenesis and vaccination of influenza A virus in swine. *Current topics in microbiology and immunology*. 2014;385:307-26.
- [4] Kyriakis CS, Brown IH, Foni E, Kuntz-Simon G, Maldonado J, Madec F, et al. Virological Surveillance and Preliminary Antigenic Characterization of Influenza Viruses in Pigs in Five European Countries from 2006 to 2008. *Zoonoses Public Health*. 2011;58:93-101.
- [5] Watson SJ, Langat P, Reid SM, Lam TT, Cotten M, Kelly M, et al. Molecular Epidemiology and Evolution of Influenza Viruses Circulating within European Swine between 2009 and 2013. *Journal of virology*. 2015;89:9920-31.
- [6] Segalés J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Research*.

2012;164:10-9.

[7] Ulmer JB, Mansoura MK, Geall AJ. Vaccines 'on demand': science fiction or a future reality. Expert opinion on drug discovery. 2015;10:101-6.

[8] Petsch B, Schnee M, Vogel AB, Lange E, Hoffmann B, Voss D, et al. Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. Nature biotechnology. 2012;30:1210-6.

3.2 Purpose

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

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

The main objective of this project is to contribute to the development of innovative, safe and effective vaccine strategies against viral respiratory diseases in pigs.

The project will focus on vaccines against SIV and PCV2; two economically important pathogens of pigs and often been associated with PRDC.

Immunogenicity and efficacy of novel nucleic acid-based vaccines will be evaluated in pigs as being the target animal.

Vaccine efficacy is strongly dependent on the activity towards recent, newly evolved strains. Therefore challenge models have continuously to be kept up to date in regard to the recent strains.

3.3 Relevance

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

Respiratory diseases in pigs are a major health concern in swine production (Opriessnig, 2011). SIV is one of the agents of porcine respiratory disease that is of particular interest, not only due to its capacity to cause disease in pigs but also due to its potential to contribute to new reassortants of flu viruses, which can be of importance for human health. SIV is associated with the 'porcine respiratory disease complex' (PRDC), where SIV may also act synergistically with other pathogens among others PCV2.

SIV are endemic to the world's swine population and there are no mandatory eradication programs (at least in Europe). Infection of pigs with SIV is beside a cause of considerable economic loss for pig farmers also a potential human health concern, as evidenced by the identification of genetic material derived from swine-adapted influenza viruses in the pandemic H1N1 (2009) influenza virus in humans.

Commercial vaccines currently available against swine influenza virus (SIV) are inactivated, adjuvanted, whole virus vaccines, based on H1N1 and/or H3N2 and/or H1N2 SIVs. In keeping with the antigenic and genetic differences between SIVs circulating in the World, the vaccines for each region are produced locally and contain different strains. Even within a continent, there is no standardization of vaccine strains, and the antigen mass and adjuvants can also differ between different commercial products (Van Reeth, 2013).

PCV2 is the primary causative agent of PCVAD, a disease that seriously affects the swine industry worldwide. Currently, control of PCV2 infection in piglets is based on vaccines. Commercial vaccines available are mainly inactivated viral vaccines, or recombinant protein-based vaccines. All such vaccines have been shown to be effective in reducing PCV2 infection, but fail to prevent infection and spread of PCV2 virus in pigs (Beach, 2012). Moreover, since the introduction of commercial vaccines, several new recombinant strains and variants with genetic mutations have emerged (Ssemadaali, 2015). A new mutant, PCV2b, has shown to exhibit increased virulence and to spread rapidly in various regions of the world. The emergence of new virulent strains emphasizes the need for updated PCV2 vaccines.

References

[1] Opriessnig T, Gimenez-Lirola LG, Halbur PG. Polymicrobial respiratory disease in pigs. Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases. 2011;12:133-48.

[2] Van Reeth K, Ma W. Swine influenza virus vaccines: to change or not to change-that's the question. *Current topics in microbiology and immunology*. 2013;370:173-200.

[3] Beach NM, Meng X-J. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research*. 2012;164:33-42.

[4] Ssemadaali MA, Ilha M, Ramamoorthy S. Genetic diversity of porcine circovirus type 2 and implications for detection and control. *Research in veterinary science*. 2015;103:179-86.

3.4 Research strategy

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

Vaccine efficacy:

The project aims to evaluate immunogenicity and efficacy of novel nucleic acid-based vaccines against viral respiratory diseases in pigs, with focus on SIV and PCV2. For this purpose, vaccine constructs will be produced on basis of virus specific genetic information within the novel vaccine platform. Comparable platforms and constructs have proven efficacy for human influenza vaccines in preclinical studies. Pigs will be vaccinated and thereafter challenged with the respective viruses. After challenge pigs will be monitored for clinical and immunological responses, virus shedding/load and pathology.

Virus challenge dose finding:

New virus strains that may evolve will be titrated *in vivo* to determine the optimal virus challenge dose for vaccine efficacy studies. For this purpose, pigs will be challenged with differenced doses virus and monitored for clinical and immunological responses, virus shedding/load and pathology.

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

Vaccine efficacy in pigs free of maternal antibodies:

In first instance young pigs, free of antibodies against influenza or PCV2 will be supplied by commercial farms with a high health status. Relevant microbiological status of the animals will be verified before purchase. After arrival and acclimatization, animals will be allocated to the different groups. Experimental groups will be vaccinated with different vaccine doses, the control group will be sham vaccinated. After vaccination immunogenicity and safety will be studied. At a predetermined time point after vaccination, all pigs will be challenged with the relevant virus. General health monitoring will be performed daily throughout the whole study and key parameters will be assessed like safety, clinical symptoms, pathology findings and viral load systemically and/or in the respiratory tract.

Vaccine efficacy in pigs with maternal antibodies:

If vaccines prove to be protective in seronegative pigs, efficacy of vaccines will be tested in young pigs in the presence of maternal derived antibodies. For this purpose, young pigs with maternal derived antibodies against influenza or PCV2 will be supplied by commercial farms with a high health status. Relevant microbiological status of the animals will be verified before purchase. After arrival and acclimatization, animals will be allocated to the different groups. Experimental groups will be vaccinated with a predetermined vaccine dose, the control group will be sham vaccinated. After vaccination immunogenicity and safety will be studied. At a predetermined time point after vaccination, all pigs will be challenged with the relevant virus. General health monitoring will be performed daily throughout the whole study and key parameters will be assessed like safety, clinical symptoms, pathology findings and viral load systemically and/or in the respiratory tract.

Virus challenge dose finding:

New virus strains will be titrated *in vivo* to determine the optimal virus challenge dose for vaccine efficacy studies. The necessity for the selection of newly evolved strains will depend on observed substantial genomic changes or changes in amino-acid sequences. For this purpose, young pigs, free of antibodies against influenza or PCV2 will be supplied by commercial farms with a high health status. Relevant microbiological status of the animals will be verified before purchase. After arrival and acclimatization, animals will be allocated to the different experimental groups. Pigs will be infected with a dose range (of increasing doses) of the new virus and one group will be infected with the reference challenge strain. General health monitoring will be performed daily throughout the whole study and key

parameters will be assessed like safety, clinical symptoms, pathology findings and viral load systemically and/or in the respiratory tract.

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

Vaccine efficacy studies will be performed in pigs, which are the target animals. Vaccines to be evaluated will all be nucleic acid based and will be identically applied. Variables in the project are the viruses, doses, challenge viruses and immune status of the pigs.

If vaccines prove to be protective in seronegative pigs, efficacy of vaccines will be tested in pigs in the presence of maternal derived antibodies. This is necessary, because the expected age of vaccination will be shortly after weaning and an interference with maternal derived antibodies cannot be excluded.

New virus strains that may evolve will be titrated *in vivo* to determine the optimal virus challenge dose for vaccine efficacy studies in pigs.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Dose finding, immunogenicity and efficacy of nucleic acid based virus vaccines in young pigs
2	Newly evolved viruses: <i>in vivo</i> titration to determine the virus challenge dose in pigs
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

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

1

General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 40100
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--|
| 1 | Dose finding, immunogenicity and efficacy of nucleic acid based virus vaccines in young pigs |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Young pigs will be vaccinated with a new nucleic acid based vaccine via intramuscular (IM) route and challenged intranasally with a relevant virus strain, i.e. swine influenza virus (SIV), or porcine circovirus type 2 (PCV2). After vaccination and challenge infection, serological responses will be determined as read out for immunogenicity. Clinical observation results, rectal temperature, body weight, virus load in respiratory tract tissues and blood (if applicable) and (histo)pathological findings will be used to determine protective vaccine efficacy.

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

Vaccine efficacy in pigs free of maternal antibodies:

A pre-bleed will be collected at the farm. In first instance young pigs, free of antibodies against influenza or PCV2 will be included in the study. The experiment will be conducted with 10 animals per treatment group; maximal five experimental groups, one reference vaccine control group and one negative challenge control. After arrival and an acclimatization period of 5-7 days pigs will be intramuscularly vaccinated or sham vaccinated, 2 times with a three weeks interval. To measure efficacy of the vaccine pigs will be intranasally challenged with the relevant virus strain (SIV or PCV2), at a predetermined time point. After challenge pigs will be followed for 3 days up to 35 days (depending on virus strain). Rectal temperature will be measured daily, starting on the day of arrival. Body weight will be measured on predetermined time points during follow-up (starting at day -1 before challenge infection). During the whole experiment pigs will be monitored for general health. Blood samples will be collected weekly

during the vaccination phase of the study. Blood samples and nasal swabs will be collected three to four times per week at predetermined time points up to week 2, twice weekly up to week 5 after challenge infection (duration follow-up depends on virus strain). Pigs will be euthanized and necropsied at a predetermined experimental endpoint (day 3-35 post challenge, or sooner if they display severe symptoms).

Vaccine efficacy in pigs with maternal antibodies:

If vaccines prove to be protective in young seronegative pigs, the same vaccine efficacy study will also be performed in young pigs in the presence of maternal derived antibodies. The experiment will be conducted with 10 animals per treatment group; maximal five experimental groups, one reference vaccine control group and one negative challenge control. After arrival and an acclimatization period of 5-7 days pigs will be intramuscularly vaccinated or sham vaccinated, two times with a three weeks interval. Experimental design to measure vaccine efficacy will be as described above.

Vaccination:

- A maximum of two vaccinations will be administered to the animals. One initial vaccinations and one booster vaccination.
- Intramusculair (IM) vaccination: the vaccine will be applied in the muscle in the neck behind the base of the ear.
- Dose: different doses of the experimental vaccine, one dose of a commercial product (reference vaccine control), one dose of sham 'vaccine' (negative challenge control).

Challenge infection:

- Challenge infection is needed to measure vaccine efficacy.
- SIV or PCV2: aerosol inoculation of the virus in the nasal cavity.
- Dose: depending on the challenge virus strain to be used.

Blood sampling:

- Repeated blood sampling is needed to evaluate the immunogenicity and efficacy of the vaccination at different time points in the experiment.
- Blood will be extracted at various time points in the procedure from the jugular vein in the neck.
- The extracted volume will never exceed 8mL/kg body weight within 2 weeks (according to Handboek Proefdierkunde, vijfde druk)
- The frequency will be max. 17 times.

Nasal swabs:

- Repeated nasal swab sampling is needed to evaluate efficacy of the vaccination at different time points in the experiment.
- The frequency will be max. 17 times.

Euthanasia:

- Animals will be anaesthetised before euthanasia.
- Tissue and blood sampling after euthanasia.
- (Histo) pathology and virological analysis on selected tissues.
- Sampling of tissue and blood and evaluation of the pathologic findings is needed to make a complete interpretation of the vaccine efficacy and immunogenicity.

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

The estimated number of animals is based on the recommendation in the European pharmacopoeia for vaccine efficacy testing of SIV vaccines, because the study information will be part of the registration documentation of the vaccine. European pharmacopoeia; 01/2008:0963 Porcine influenza vaccine, §2.3.2.

If studies are not intended to be added to a registration file, the number of animals will be calculated on the basis of a reduction of the virus titre after challenge by at least 50% and a power of 0.8 with a p value of <0.05. The expected numbers depend on the variance of the achieved titre after challenge during dose defining studies. The exact number will be calculated, but on forehand is expected to be not higher than 10. Information on this will be shared with the IvD.

B. The animals

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

The experiment will be performed with young pigs derived from a commercial breeder. Pigs will be 3-4 weeks old at the beginning of the experiment.

- Estimated number of animals: initial experiment with pigs free of maternal antibodies: 10 animals per treatment group, maximum 7 groups per experiment per virus (SIV or PCV2). Estimated number experiments is four, the maximum number of animals is: 280.
- Estimated number of animals in second experiment to evaluate influence of maternal antibodies: 10 animals per treatment group, maximum 7 groups per experiment per virus (SIV or PCV2). Estimated number of experiments is four and the maximum number of animals is: 280.
- Total estimated number of pig: 560

Pigs of 3-4 weeks old, the age recommended for vaccination.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

- No, continue with question D.
- Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

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

- No
- Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: Use of the target animal is essential for vaccine immunogenicity and efficacy studies. The complex interaction between pathogen, vaccination and immunity of target animal cannot be replaced by a model in which no animals are used. New vaccines will be first tested in *in vitro* before testing on the target animal, to prevent unnecessary animal use.

Reduction: In each experiment a critical evaluation will be done in regard to necessary minimal number of animals to the key parameters. If an experiment is not related to registration relevant information, the number of pigs per study will be estimated on basis of the requested power and size effect and be discussed with the IvD. This evaluation is based on a range of previously performed experiments.

Refinement: The studies are intended to evaluate immunogenicity and efficacy of vaccines, which will be used in pigs. Therefore, it is most recommendable to perform the vaccine immunogenicity and efficacy studies in the target animal. Animals will be housed in groups. Pens will be enriched with wood shaves bedding and suitable toys that will be changed regularly.

The animals will be monitored twice a day during critical periods of the experiment or during veterinary emergency. Humane endpoints will be defined and accordingly be applied.

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

Suffering of animals related to experimental procedures as described in 2A are considered to induce mild suffering, pain or fear. Challenge infection can cause illness and suffering, but to our experience both virus challenges result in mild or subclinical course of disease. For blood and nasal swab sampling, vaccination and challenge infection no measures will be taken to minimize the pain and fear. The animals will be anaesthetised before euthanasia to minimize pain and fear.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Literature search and personal communication will be a continuous process to keep up to date on new developments in the field veterinary vaccine development.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

Procedures; blood and nasal swab collection, vaccination and challenge are considered to induce mild, short during pain and/or procedure related stress. Clinical signs of disease are considered to induce moderate discomfort. The assessed clinical signs are the critical parameters in the use of the model and treatment of clinical signs with analgesics or other pain relieving methods will interfere with these parameters.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The challenge with the virus can cause illness and discomfort (especially in control animals) and the vaccination can cause a local reaction in the muscle and skin. SIV infection resembles flu episodes in humans and is characterized by an acute febrile respiratory disease of usually short duration. SIV infection and PCV2 infection related complications are not expected in an experimental setting within the animal facility. PCV2 infection related clinical signs may comprise respiratory distress, dyspnea, diarrhea,

however only after complications by an additional infection.

Explain why these effects may emerge.

Although it is likely that vaccination will prevent illness after challenge in the most cases, there will always be individual variability and animals can be affected and show clinical illness. The control animals may experience virus infection related fever, respiratory and or gastrointestinal problems.

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

Challenged and vaccinated animals will be closely and daily monitored for illness with a special focus on virus infection related clinical signs. The following parameters will be measured daily (general impression (activity), respiration rate, food consumption and body temperature). In case of illness and discomfort responsible veterinarian will be consulted.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Monitoring for clinical signs of disease will be performed daily. SIV or PCV2 related clinical signs of disease will be registered systematically according to a defined clinical scoring system. Humane endpoints are defined:

- In case of influenza; if animals develop a severe respiratory distress observed in two consecutive observations with laboured breathing, or open mouth breathing during one observation.
- In case of PCV2; not any clinical sign is expected after a single infection with PCV2 and if clinical signs occur, animals will be removed from the study on basis of Good Veterinary Practice.

Indicate the likely incidence.

This incidence is unlikely.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

The expected level of discomfort is classified as moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals will be euthanized at the end of the study to perform gross pathology and in particular pathological examination of the respiratory tract and sampling of tissues for analyses of essential parameters of the study.

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1

General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek	
1.3	List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 2	Type of animal procedure Newly evolved viruses: <i>in vivo</i> titration to determine the virus challenge dose in pigs

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

New antigenically different Swine Influenza Virus (SIV) and Porcine Circovirus type 2 (PCV2) subtypes may evolve due to genetic changes and become target for vaccine development. To evaluate immunogenicity and efficacy of these vaccines, the challenge dose of the new virus has first to be established *in vivo*. Young pigs will be challenged via the intranasal route with a newly evolved, antigenically changed virus strain. After challenge infection, serological responses and the clinical observation results, rectal temperature, body weight, virus load in respiratory tract tissues and blood (if applicable) and (histo)pathological findings will be used to determine challenge infectious dose.

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

A pre-bleed will be collected at the farm. Young pigs, free of antibodies against SIV or PCV2 will be included in the study. The experiment will be conducted with 6 animals in each group. Groups of pigs will be infected with a dose range of the new virus and one group will be infected with the reference challenge strain. After challenge infection pigs will be followed for 3 days to 21 days (depending on the virus strain). Rectal temperature will be measured daily, starting on the day of arrival. Body weight will be measured on predetermined time points during follow-up (starting at day -1 before challenge infection). During the whole experiment pigs will be monitored for general health. Blood samples and nasal swabs will be collected three to four times per week at predetermined time points up to week 2 and twice weekly up to week 3 after challenge infection (duration follow-up depends on virus strain). Pigs will be euthanized and necropsied at a predetermined experimental endpoint (day 21 post challenge, or

sooner if they display severe symptoms).

Challenge infection:

- Challenge infection is needed to establish the virus titre.
- SIV or PCV2: aerosol inoculation of the virus in the nasal cavity.
- Dose: different doses of the virus and depending on the virus strain to be titrated.

Blood sampling:

- Repeated blood sampling is needed to evaluate virus infectious dose at different time points in the experiment.
- Blood will be extracted at various time points in the procedure from the jugular vein in the neck
- The extracted volume will never exceed 8mL/kg body weight within 2 weeks (according to Handboek Proefdierkunde, vijfde druk)
- The frequency will be max. 10 times.

Nasal swabs:

- Repeated nasal swab sampling is needed to evaluate virus infectious dose at different time points in the experiment.
- The frequency will be max. 10 times.

Euthanasia:

- Animals will be anaesthetised before euthanasia.
- Tissue and blood sampling after euthanasia
- (Histo) pathology and virological analysis on selected tissues
- Sampling of tissue and blood and evaluation of the pathologic findings is needed to evaluate the virus infectious dose.

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

In this study we want to determine the infectious challenge dose of the new virus strain in our model compared to the regular used reference strain. For this purpose we consider 6 animals per dose group sufficient to assess the different aspects of the model (virus load, clinical course, pathology findings). Between 2 successive-dose groups no difference should be observed in regard to virus load or kinetics after challenge infection and not more than 33% reduction in pathology findings and clinical parameters (power =0.8, p <0.05).

B. The animals

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

The experiment will be performed with pigs derived from a commercial breeder. Pigs will be 3-4 weeks old at the beginning of the experiment.

- Estimated number of animals in *in vivo* titration: 6 animals per treatment group, 6 groups per experiment per virus(SIV or PCV2) and with a maximum of 2 experiments per virus. Total estimated number of animals in four experiments: 144.

Pigs of 3-4 weeks old, the age recommended for vaccine efficacy studies.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

- No, continue with question D.
- Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

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

- No
- Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: use of the target animal is essential for establishing the *in vivo* virus infectious challenge dose. The complex interaction between pathogen and target animal cannot be replaced by a model in which no animals are used. New viruses will be first tested *in vitro* before testing on the target animal, to prevent unnecessary animal use.

Reduction: In each experiment a critical evaluation will be done in regard to necessary minimal number of animals to the key parameters. The number of pigs per study will be estimated on basis of the requested power and size effect and be discussed with the IvD. This evaluation is based on a range of previously performed experiments.

Refinement: The studies are intended to support efficacy evaluation of new vaccines, using new viruses which may evolve in pigs. Therefore, it is most recommendable to establish the *in vivo* virus titre in pigs, which are the target animals. Animals will be housed in groups. Pens will be enriched with wood shave bedding and suitable toys that will be changed regularly.

The animals will be monitored twice a day during critical periods of the experiment or during veterinary emergency. Humane endpoints will be defined and accordingly be applied.

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

Suffering of animals related to experimental procedures as described in 2A are considered to induce mild suffering, pain or fear. Challenge infection can cause illness and suffering. For blood and nasal swab sampling and challenge infection no measures will be taken to minimize the pain and fear. The animals will be anaesthetised before euthanasia to minimize pain and fear.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Literature search and personal communication will be a continuous process to keep up to date on new developments in the field of new emerging viruses and veterinary vaccine development.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

Procedures; blood and nasal swab collection and challenge infection are considered to induce mild, short duration pain and/or procedure related stress. Clinical signs of disease are considered to induce moderate discomfort. The assessed clinical signs are the critical parameters in the use of the model and treatment of clinical signs with analgesics or other pain relieving methods will interfere with these parameters.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Infection with the virus can cause illness. SIV infection resembles flu episodes in humans and is characterized by an acute febrile respiratory disease of usually short duration. Flu related complications are not expected in an experimental setting within the animal facility. PCV2 infection related clinical signs may comprise respiratory distress, dyspnea, diarrhea, however only after complications by an additional infection.

Explain why these effects may emerge.

Animals may experience virus infection related clinical signs; fever, respiratory and or gastrointestinal problems.

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

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

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Monitoring for clinical signs of disease will be performed daily. SIV or PCV2 related clinical signs of disease will be registered systematically according to a defined clinical scoring system. Humane endpoints are defined:

- In case of influenza; if animals develop a severe respiratory distress observed in two consecutive observations with laboured breathing, or open mouth breathing during one observation.
- In case of PCV2; not any clinical sign is expected after a single infection with PCV2 and if clinical

signs occur, animals will be removed from the study on basis of Good Veterinary Practice.

Indicate the likely incidence.

Virulence of new strains is in principle unknown, nevertheless it is considered on basis of comparable studies that the occurrence of clinical signs as described as HEPs is unlikely.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

The expected level of discomfort is classified as moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals will be euthanized at the end of the study to perform gross pathology and in particular pathological examination of the respiratory tract and sampling of tissues for analyses of essential parameters of the study.

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

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

Yes



Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Geachte CCD,

Onderstaand het advies dat de DEC-WUR heeft gegeven aangaande het project
"Immunogenicity and efficacy of innovative vaccines against respiratory diseases in pigs"

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD401002016417**
2. Titel van het project: Immunogenicity and efficacy of innovative vaccines against respiratory diseases in pigs
3. Titel van de NTS: Werkzaamheid van nieuw ontwikkelde vaccins tegen virale luchtweginfecties in varkens
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
DEC-WUR
[Redacted]
Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 29-02-2016
Aanvraag compleet: 29-02-2016
In vergadering besproken: 21-03-2016
7. Correspondentie met de aanvrager
Datum vragen: 23-03-2016
 - De DEC had enkel vragen over tekstuele verduidelijkingen/aanpassingenDatum antwoorden: 31-03-2016
Strekking van de antwoorden:
 - De onderzoeker heeft de suggesties van de DEC overgenomenDe antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project vergunningplichtig is (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag is een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over de aanvraag te adviseren vanuit het oogpunt van onafhankelijkheid, onpartijdigheid en beschikbare expertises.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering.

Dierexperimenten
Commissie WUR

DATE
14 april 2016

ONDERWERP
aanvraag projectvergunning
AVD401002016417

ORIS KENMERK
AVD401002016417

POSTADRES
[Redacted]

BEZOEKADRES
[Redacted]

INTERNET
www.wageningenUR.nl

LOK NUMMER
09098104

CONTACTPERSOON
[Redacted]

TELEFOON
[Redacted]

E-MAIL
DEC@wur.nl

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord is.
2. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.
3. Het substantiële belang van het project, te weten het voorkomen/verminderen van virale luchtweginfecties bij varkens, wordt door de DEC onderschreven.
4. De DEC stelt vast dat de expertise van de onderzoekers, de voorzieningen waar de experimenten uitgevoerd worden en de onderzoeksstrategie kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling van het project.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "moderate" realistisch is ingeschat en geëvalueerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit biotechnische handelingen zoals bloedafname en verkrijgen van neusswabs en de daarbij optredende handelingsstress en voor een deel van de dieren klinische verschijnselen die te vergelijken zijn met een lichte griep.
7. De DEC heeft vastgesteld dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. De complexiteit tussen vaccin, afweersysteem en ziekteverwekker kan niet anders dan in het doeldier onderzocht worden.
8. De DEC heeft vastgesteld dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Door slechts de meest veelbelovende vaccins *in vivo* te testen en daarbij gebruik te maken van statistische analyses wordt het aantal dieren tot een minimum teruggebracht. De aanvrager beschikt over voldoende expertise om te voorkomen dat eerder gedaan onderzoek herhaald wordt.
9. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. In dit onderzoek worden de dieren in groepen gehouden. Door het definiëren van HEP's wordt ernstig lijden van de dieren voorkomen. De DEC is overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
10. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
11. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7.

D. Ethische afweging

- De DEC is in consensus van mening dat het doel en de haalbaarheid van het project het gebruik van proefdieren en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan rechtvaardigt. Dit project kan een bijdrage leveren aan het terugdringen van virale luchtweginfecties in de varkenshouderij. Dit heeft een hoger dierenwelzijn tot gevolg en is tevens van economisch belang. De uitvoering is verder niet in strijd met andere ethische overwegingen m.b.t. het gebruik van proefdieren.

E. Advies

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

Met vriendelijke groet,





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

[Redacted]

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN UR



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD401002016417

Bijlagen

2

Datum 25 februari 2016

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 24 februari 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD401002016417. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 40100

Naam instelling of organisatie: Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde:

KvK-nummer: 9098104

Straat en huisnummer: Akkermaalsbos 12

Postbus: 59

Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN UR

IBAN: NL10RABO0397066465

Tenaamstelling van het
rekeningnummer: WAGENINGEN UR

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie: Onderzoeker

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Onderzoeker
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 april 2016
Geplande einddatum: 1 april 2021
Titel project: Immunogenicity and efficacy of innovative vaccines against respiratory diseases in pigs
Titel niet-technische samenvatting: Werkzaamheid van nieuw ontwikkelde vaccins tegen virale luchtweginfecties in varkens
Naam DEC: DEC Wageningen UR
Postadres DEC: Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen
E-mailadres DEC: dec@wur.nl

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Wageningen
Datum: 25 februari 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN UR



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD401002016417

Bijlagen

2

Datum 25 februari 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 25 februari 2016

Vervaldatum: 26 maart 2016

Factuurnummer: 16700417

Ordernummer: WUR938730

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD401002016417	€ 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.

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: vrijdag 15 april 2016 11:04
Aan: 'info@zbo-ccd.nl'
Onderwerp: vraag over geslacht biggen in aanvraag met projectvergunning AVD401002016417

L.S.

Projectvoorstel SIV-PCV2 onder nummer AVD401002016417: Het geslacht van de biggen zal afhangen van beschikbaarheid van de dieren. De voorkeur gaat uit naar alleen mannen of vrouwen, omdat de dieren in groepen gehuisvest worden. Uit ervaring blijkt dat meer mannelijke dan vrouwelijke biggen beschikbaar zijn.

Ik hoop hiermee uw vraag te hebben beantwoord.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED] Wageningen UR

[REDACTED]
[REDACTED], The Netherlands

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002016417
Bijlagen
1

Datum 26 april 2016

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 24 februari 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Immunogenicity and efficacy of innovative vaccines against respiratory diseases in pigs" met aanvraagnummer AVD401002016417. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 15 april 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft de vraag van de CCD over het geslacht van de biggen beantwoord.

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. Omdat uit uw aanvraag blijkt dat de vaccins en de nieuwe virusstammen niet voor het begin van het project voldoende bekend zijn, is een voorwaarde opgenomen dat u de keuze hiervan, en de keuze om een vaccin ook in varkens met maternal derived antibodies te testen met de IVD moet afstemmen.

De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, subid 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 "Immunogenicity and efficacy of innovative vaccines against respiratory diseases in pigs" starten. De vergunning wordt afgegeven van 26 april 2016 tot en met 1 april 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 DEC Wageningen UR gevoegd. Dit advies is opgesteld op 14 april 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

In aanvulling op het DEC-advies stelt de CCD voorwaarden. De voorwaarden staan in de vergunning beschreven. Voor het overige nemen wij het advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. 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.

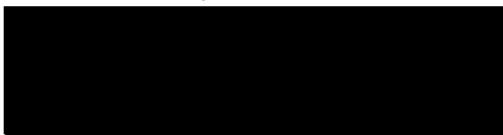
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<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. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma
plv Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

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

deze projectvergunning voor het tijdvak 26 april 2016 tot en met 1 april 2021, voor het project "Immunogenicity and efficacy of innovative vaccines against respiratory diseases in pigs" met aanvraagnummer AVD401002016417, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. In aanvulling op het advies van de DEC wordt een specifieke en een algemene voorwaarde gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 24 februari 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per op 14 april 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per op 14 april 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 14 april 2016, ontvangen op 14 april 2016.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 15 april 2016

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Dose finding, immunogenicity and efficacy of nucleic acid based virus vaccines in young pigs	Varkens (<i>Sus scrofa domestica</i>) /	560	Matig	
Newly evolved viruses: in vivo titration to determine the virus challenge dose in pigs	Varkens (<i>Sus scrofa domestica</i>) /	144	Matig	

Voorwaarden

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

Specifieke voorwaarde:

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat de keuze van de vaccins en virusstammen, en de keuze om wel dan niet een vaccin verder in varkens met maternal derived antibodies te testen worden afgestemd met de IvD.

Algemene voorwaarde:

In artikel 10, sublid 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.