

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 93118, 2509 AC Den Haag.

Datum:

17 september 2019

Aanvraagnummer:

AVD7310020198244

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:

10.2 .e. en g

drs. F. Braunstahl
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: HAS Hogeschool
Adres: Postbus 90108
Postcode en plaats: 5200 MA S HERTOGENBOSCH
Deelnemersnummer: 73100

deze projectvergunning voor het tijdvak 17 september 2019 tot en met 31 augustus 2023, voor het project "Praktijkonderzoek Precision Livestock and Healthy Farming" met aanvraagnummer AVD7310020198244, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Lector. Voor de uitvoering van het project en voor de overeenstemming ervan met de verleende projectvergunning is Hogeschooldocente; Dierenarts verantwoordelijk.

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 14 juni 2019
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 2 september 2019;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 Bovendrempelige handelingen voor het verzamelen van data en monsters tbv vergelijkingsanalyses (scannen (echo) transrectaal (rund), aanprikken oppervlakkig gelegen bloedvaten (rund) en onderhuidse sensorimplantatie (varken)), zoals ontvangen op 2 september 2019;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 2 september 2019;
 - d Advies van Dierexperimentencommissie zoals ontvangen op 2 september 2019.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1 Bovendrempelige handelingen voor het verzamelen van data en monsters tbv vergelijkingsanalyses (scannen (echo) transrectaal (rund), aanprikken oppervlakkig gelegen bloedvaten (rund) en onderhuidse sensorimplantatie (varken))			
	Runderen (Bos taurus)	250	100,0% Licht
	Varkens (Sus scrofa domesticus)	250	100,0% Licht

Aanvraagnummer:
AVD7310020198244

Ter informatie

Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD7310020198244

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 onvereenigbaar 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

Aanvraagnummer:

AVD7310020198244

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.

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).



Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800	AVD108002015175
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Utrecht	
1.3 Vul de titel van het project in.	Alternatieven voor antibiotica bij varkens.	

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

Infectieuze ziektes zijn een groot probleem in de dierhouderij. Om infecties tegen te gaan worden op grote schaal antibiotica gebruikt. Decennialang gebruik van verschillende antibiotica op grote schaal heeft er voor gezorgd dat vele pathogenen inmiddels resistentie hebben ontwikkeld. Omdat deze pathogenen niet meer goed te behandelen zijn, vormen ze niet alleen een groot veterinair probleem, maar ook een probleem voor de volksgezondheid.

In het Convenant Antibioticaresistentie Dierhouderij dat in 2008 is opgesteld door vertegenwoordigers van verschillende dierhouderijsectoren is vastgesteld dat het gebruik van antibiotica sterk moet verminderen. Onder deze sectoren vallen onder andere de pluimveehouderij en varkenshouderij. Dit houdt in dat het voorschrijven van antibiotica transparanter moet worden en worden verminderd (<http://www.rijksoverheid.nl/documenten-en-publicaties/kamerstukken/2008/12/08/convenant-antibioticaresistentie-dierhouderij.html>).

Om het gebruik van conventionele antibiotica te verminderen zijn alternatieven nodig die in de intensieve dierhouderij gebruikt kunnen worden. Doordat de meeste huidige antibiotica, gebruikt in mens en dier, vaak via een enkelvoudig en zeer specifiek mechanisme werken, ontwikkelen pathogenen sneller een resistentie voor deze antibiotica. Tot nu toe zijn er geen tot weinig goede alternatieven voor antibiotica. Een mogelijk alternatief zijn antibacteriële / immuunmodulerende peptiden. Deze natuurlijke afweerpeptiden, zogenaamde Host Defence Peptides (HDPs), zijn beschreven in vele species, waaronder planten, insecten, amfibieën en zoogdieren. Ze hebben een grote verscheidenheid aan functies van directe antibacteriële activiteit tot het moduleren van het immuunsysteem (Hilchie AL, *et al.* Nature chemical biology. 2013(9)761-768). Door de veelzijdige eigenschappen van HDPs en aangezien de belangrijkste eigenschap immunomodulatie is, zullen pathogenen minder snel resistentie ontwikkelen. De mate van resistentieontwikkeling kan ook nog verschillen tussen verschillende HDPs. Bijvoorbeeld, het langdurig kweken van bacteriën met een suboptimale concentratie van LL37 resulteerde in een verhoogde concentratie peptide die nodig was om de bacteriën te doden (Lofton H *et al.*, PlosOne. 2013(8)), hoewel dit voor kippen cathelicins nauwelijks het geval was (Veldhuizen EJA, *et al.* PlosOne. 2013(8)). Echter, wij willen de sa-Peptiden inzetten op een profylactische manier, zodat de kans op resistentie zeer klein zal zijn.

Het onderzoek wordt gesubsidieerd door het ministerie van economische zaken als onderdeel van het ALTERNATIVES FOR ANTIBIOTICS (ALTANT) programma (Kien - Nieuwsbrief Kennis en Innovatie - <http://www.rijksoverheid.nl/documenten-en-publicaties/brochures/2010/12/08/kien-nieuwsbrief-kennis-en-innovatie-nummer-8-december-2010.html>). In samenwerking met het farmaceutische bedrijf Zoetis bestuderen we de werking van HDPs in kippen en varkens. Deze HDPs zullen worden gebruikt als voorbeeld voor een mogelijk alternatief voor antibiotica. We hebben verschillende peptiden ontwikkeld afgeleid van zowel kippen- als varkens-HDPs. De aanpassingen bestaan uit inkorten aan de N-terminus of de C-terminus van het peptide. Daarnaast hebben we peptiden waarvan positieve aminozuren worden vervangen door neutrale aminozuren of hybrididen gemaakt van twee verschillende HDPs. Deze ontwikkelde peptiden noemen we vanaf nu synthetisch afgeleide peptiden (**sa-Peptiden**). De gemaakte aanpassingen kunnen van invloed zijn op de werking

van de sa-Peptiden. We hebben gezien wanneer de peptiden te kort worden, ze een verminderde werking kunnen hebben (Veldhuizen EJA, et al./ PlosOne. 2014(9)). We zullen alle nieuwe sa-Peptiden daarom eerst uitvoerig *in vitro* testen.

In de kip hebben we een sa-Peptide getest dat is afgeleid van een kippen-HDP. Het sa-Peptide is *in ovo* toegediend 3 dagen voordat de kuikens uitkomen. De kuikens werden, wanneer ze een week oud waren, blootgesteld aan verschillende infecties (*E. Coli* en *Salmonella*). De kuikens die behandeld waren met het sa-Peptiden hadden een lagere infectiescore en minder laesies. Uit deze resultaten blijkt dat dit sa-Peptide beschermend werkt in kippen bij een infectie. Deze data wordt gereedgemaakt voor publicatie. Momenteel zijn we het werkingsmechanisme van deze sa-Peptiden aan het bestuderen. Het peptide moduleert de chemokine productie. Daarnaast remt het peptide de inflammatoire werking van LPS doordat het bindt aan LPS. Een tweede octrooi aanvraag is zojuist openbaar gemaakt. Antimicrobial peptide based on CMAP27 (US-2012-0093844-A1) en New CATH-2 derivatives (EP14167718.7).

In het varken zijn veel verschillende HDPs gevonden. Deze HDPs zijn in verband gebracht met een versnelde wondgenezing (Steintraesser L., PlosOne, 2012) en een beschermende functie in biggen van 4 weken of ouder tegen *B. pertussis* (Elahi S., Infection and Immunity, 2006). Echter, over hoe deze peptiden precies werken is weinig bekend. Wij willen in dit project verschillende sa-Peptiden ontwikkelen en op deze manier het werkingsmechanisme achterhalen. Dit zullen we eerst *in vitro* doen, dan *in vivo* en als laatste in een infectiemodel.

Om de toepassing van sa-Peptiden in zoogdieren te onderzoeken, willen we de sa-Peptiden eerst in een muismodel testen. In het muismodel kunnen we verschillende routes voor toediening testen. Hoewel de kennis over de immuunrespons in varkens de laatste jaren is gegroeid, is deze nog steeds beperkter dan in de muis. We verwachten dat de resultaten verkregen met de muis in grote lijnen overeen komen met die van het varken. De translatie van bijvoorbeeld de antigeen presentatie van de muis naar varkens geeft veelbelovende resultaten, maar de immuunrespons is niet in alle opzichten gelijk (Alvarez B. Developmental and Comparative Immunology. 2013).

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het doel van dit project is het bestuderen van verschillende peptiden die zijn afgeleid van HDPs, om als mogelijk alternatief gebruikt te worden voor conventionele antibiotica. De sa-Peptiden worden eerst *in vitro* getest en daarna *in vivo*. We zullen de immuunmodulerende capaciteit bepalen van de peptiden op verschillende immuuncellen en ook de eventuele cytotoxiciteit op de gastheercellen. We zullen kijken naar cellen van de muis en cellen van het varken. Ook zullen we de directe bactericide activiteit bepalen. Op deze manier kunnen we een goede inschatting maken van de optimale dosis waarin we de sa-Peptiden kunnen gebruiken als alternatief voor antibiotica. In de *in vivo* fase zullen we bepalen wat de beste route van toedienen is en de optimale concentratie en formulatie. In de laatste fase van het project willen we de sa-Peptiden die nog altijd een goede kandidaat zijn voor een alternatief antibioticum selecteren. Deze zullen we testen in een infectiemodel.

Het *in ovo* toedienen (drie dagen voor het uitkomen van de eieren) van een sa-Peptide heeft een langdurig beschermend effect in de kip bij verschillende infecties (*E. Coli* en *Salmonella*). De met sa-Peptide behandelde dieren hadden lagere infectiescores en minder laesievorming. Deze data wordt momenteel klaargemaakt voor publicatie. Dit lange termijn effect verwachten we ook in zoogdieren te vinden. We zullen dit eerst in de muis bestuderen en daarna ook in het varken. Om dit goed te kunnen bestuderen zullen we naar verschillende parameters kijken. We zullen het algemene bloedbeeld bestuderen, dit betekent

dat we naar de verhouding van de verschillende cellen zullen kijken, zoals T- en B-cellen, maar ook naar de cytokine expressie in het plasma. We zullen de immuuncellen na de *in vivo* toediening ook *in vitro* uitgebreid analyseren op een veranderde functie, zoals fagocytose en cytokine-/chemokine-secretie, de mogelijkheid tot T-cel stimulatie en de reactie op verschillende stimuli (zoals LPS).

Aan het eind van het project willen we sa-Peptiden overhouden die veilig gebruikt kunnen worden in biggen en resulteren in een vermindering van infecties in biggen. Omdat biggen steeds eerder gespeend worden, zijn (dodelijke) infecties een groot probleem in de varkenshouderijen (Bulens et al. (2013). Economische en technische kengetallen in het moderne varkensbedrijf). De focus zal in dit project daarom ook bij biggen liggen.

We hebben dit project mondeling besproken met een specialist van de afdeling landbouwhuisdieren, dr. van Nes. Hij was van mening dat het project haalbaar was en de verschillende toedieningsroutes allemaal te implementeren zouden zijn, hoewel zijn voorkeur uitgaat naar intramusculaire of subcutane toediening omdat deze makkelijker te implementeren zijn in de varkenshouderijen. Ook tijdens het project zullen we contact houden met dr. van Nes.

De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met het werken met peptiden, daarnaast zijn de betrokken onderzoekers voor de dierproeven reeds art. 9 gekwalificeerd. We hoeven geen bijzondere KO muizen te fokken, waardoor we bij goedkeuring van het project direct kunnen starten. Wij gaan ervan uit het volledige project in 5 jaar doorlopen zou moeten kunnen worden met de verschillende sa-Peptiden. We streven er naar een selectie van sa-Peptiden in elke fase, waardoor we minder sa-Peptiden hoeven te testen in de infectiefase.

3.3 Belang

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

Het antibioticagebruik in de commerciële varkenshouderij dient, vanwege het ontstaan van resistentie tegen deze antibiotica, drastisch gereduceerd te worden. De meeste huidige antibiotica werken via enkelvoudige en zeer specifieke mechanismen, waardoor pathogenen sneller een resistentie voor deze antibiotica ontwikkelen.

Met dit onderzoek willen we een alternatief vinden voor de conventionele antibiotica. Hiervoor gebruiken we afgeleiden van natuurlijke afweerpeptiden. Het grote voordeel van deze peptiden is dat ze op een veelzijdige manier werken en niet via een enkelvoudig mechanisme zoals veel van de conventionele antibiotica. Daarnaast hebben ze een grote verscheidenheid aan functies, van directe antibacteriële activiteit tot het moduleren van het immuunsysteem, waardoor het ontwikkelen van resistentie veel complexer wordt.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

We hebben peptiden ontworpen die zijn afgeleid van HDPs van zowel de kip als het varken, welke we van nu af aan synthetisch afgeleide peptiden (sa-Peptiden) zullen noemen. We zullen deze sa-Peptiden testen zowel in de muis als in het varken. Hoewel het immuunsysteem van de muis en het varken niet identiek zijn, zijn er veel overeenkomsten. Daarom verwachten we dat de resultaten die we in de muis zullen vinden, grotendeels hetzelfde zullen zijn in het varken. We hebben ervoor gekozen om veel van het onderzoek (met name voor de *in vivo* delen) eerst in de muis te doen voordat we naar het varken gaan. De reden hiervoor is dat er in de muis meer bekend is over het immuunsysteem en er een grotere 'toolbox' beschikbaar is. Een groot voordeel is dat er veel protocollen zijn voor de muis en er meer gelabelde antilichamen voor de FACS zijn, waardoor we complexere kleuringen kunnen maken. Daarnaast is er meer bekend over het *ex vivo* kweken van verschillende cellen, waardoor we sneller de functie van de sa-Peptiden kunnen achterhalen. Dit onderzoek zullen we daarna in het varken herhalen. Omdat we al weten naar welke parameters we moeten kijken, hebben we minder dieren nodig. Hoewel er minder antilichamen voor het varken beschikbaar zijn, kunnen we, met de informatie vanuit de muis, de resultaten herhalen met minder complexe kleuringen

omdat we weten waar we naar moeten kijken. In het varken hoeven we niet alle proeven en protocollen te herhalen die in de muis geen duidelijke antwoorden gaven. Daarmee kunnen we, ook al is de 'toolbox' van het varken aanzienlijk kleiner dan in de muis toch de antwoorden krijgen die we nodig hebben om een goed beeld te krijgen van de werking van sa-Peptiden, zowel *in vitro*, *ex vivo*, als *in vivo*.

Fase 1

De sa-Peptiden zullen eerst uitvoerig getest worden *in vitro* met behulp van verschillende cellijnen en primaire cellen van zowel muizen als varkens. In deze fase van het onderzoek zullen we vele verschillende sa-Peptiden bestuderen. We zullen ook altijd twee peptiden includeren waarvan de werking bekend is in de mens of in de kip. We zullen alle sa-Peptiden testen voor cytotoxische activiteit (activiteit van cellen, markers van apoptose op het celoppervlak), immunomodulerende activiteit (e.g. cytokines en activatiemoleculen op het celoppervlak en reacties op verschillende stimuli zoals LPS of op complete bacteriën) en antibacteriële activiteit. Primaire cellen (geïsoleerd vanuit het bloed, beenmerg en verschillende andere organen) van muizen en varkens zullen nodig zijn om een realistisch beeld krijgen van de effecten van de sa-Peptiden op de cellen. Het grote voordeel van cellijnen, de onsterfelijkheid, is tegelijk ook het grote nadeel. De cellijnen kunnen na verloop van tijd hun cel-specifieke eigenschappen verliezen en lijken dan meer op tumorcellen. Door de immunomodulerende activiteit op primaire cellen te bestuderen, komen we zo dicht mogelijk bij de *in vivo* resultaten. Daarnaast is het mogelijk met primaire cellen om complexere kweken te bestuderen en daarmee de invloed verschillende celtypen in de response naar de sa-Peptiden. De primaire cellen zullen we tevens gebruiken om eventuele onverwachte negatieve effecten van de toedieningsroute (op bijvoorbeeld de huid en spiercellen) al *in vitro* te bestuderen.

Fase 2a (muis) en Fase 2b (varken)

- A. De volgende stap is het bestuderen van de functie van sa-Peptiden *in vivo*. Voor deze fase maken we een selectie van de sa-Peptiden aan de hand van de beslisboom, bijgevoegd in deze sectie van de aanvraag. De geselecteerde sa-Peptiden hebben zo min mogelijk negatieve effecten op de gastheercellen en zo veel mogelijk immunomodulerende effecten. We zullen in deze fase maximaal 3 peptiden selecteren om verder te testen. We zullen deze selectie van sa-Peptiden eerst testen in de muis. We zullen bepalen welke route van toedienen een maximaal effect geeft met zo min mogelijk negatieve gevolgen voor het dier. Voor een optimale werking van de sa-Peptiden kan niet alleen de toedieningsroute een groot verschil maken, maar ook de formulatie waarin de sa-Peptiden zijn opgelost en de concentratie van het toegediende sa-Peptide. Daarnaast zullen we bestuderen hoe lang het effect aanhoudt door de muizen op 3 verschillende tijdstippen te analyseren. Deze resultaten zijn van cruciaal belang, zodat we de sa-Peptiden zo efficiënt mogelijk kunnen testen in de volgende fase met infecties.
- B. Aan de hand van wat we in de muis hebben gevonden, selecteren we 1 toedieningsroute en 1 formulatie per sa-Peptide (de optimale formulatie en toedieningsroute kan verschillen per sa-Peptide) om te testen in het varken. We verwachten dat de toedieningsroute en de formulatie hetzelfde zullen zijn in de muis en in het varken. Omdat het bloed een belangrijke parameter is voor de werking van de sa-Peptiden, zullen we het varken in de tijd volgen. Dit betekent dat we in de tijd maximaal zes keer bloed zullen afnemen (nooit meer dan de maximaal toegestane hoeveelheid en altijd in overleg met een dierenarts) en op het laatste tijdstip de dieren zullen opofferen om een compleet beeld te krijgen. Wel zullen we een concentratie reeks doen, omdat de optimale concentratie van toegediende sa-Peptide kan verschillen tussen muis en varken.

Fase 3

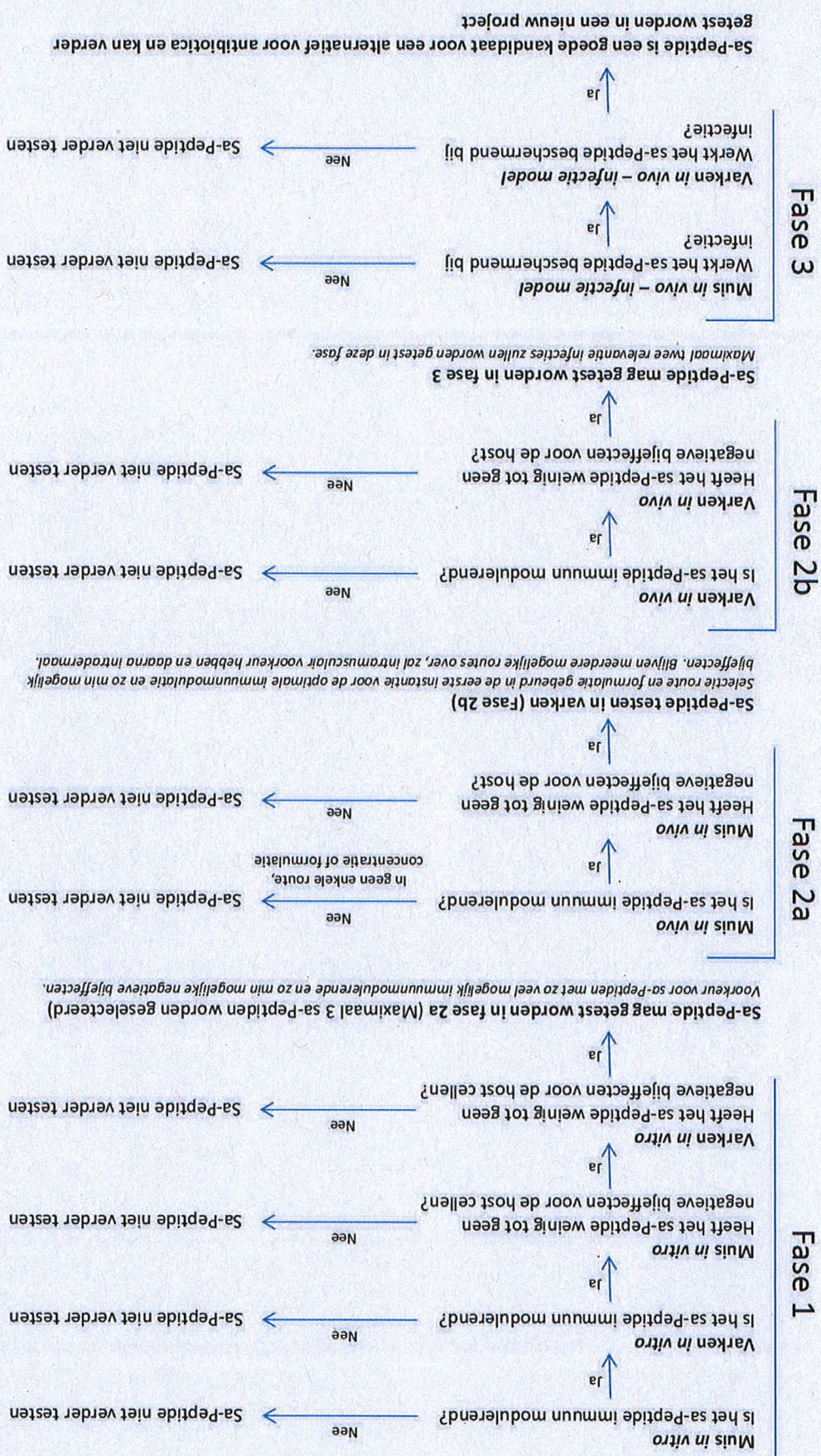
WIJZIGING #8 > Er zal een pilot infectie studie met een *S.Suis* infectie muizen model, worden uitgevoerd voordat Fase 2 is afgerond, om er zeker van te zijn dat de peptiden in de muis een profylactische werking hebben.

WIJZIGING #15 > 10.1 c en 10.2 g

Recent is gebleken dat de sa-Peptiden minder effect hebben in vivo op

Gram positieve bacteriën dan op Gram-Negatieve bacteriën.

In de laatste fase zullen we een infectiemodel opzetten, zowel bij de muis als bij het varken. We hebben in de vorige fase de sa-Peptiden uitgebreid getest *in vivo* en aangevuld met *ex vivo* experimenten. We hebben nu informatie over welke sa-Peptiden goede kandidaten zijn voor een alternatief antibioticum. De geselecteerde sa-Peptiden (maximaal 3) zullen we via 1 toedieningsroute in 1 formulatie en in 1 concentratie per sa-Peptide toedienen. De selectie van sa-Peptiden, toedieningsroute, formulatie en concentratie is gemaakt op het grootste positieve effect, zowel bij de directe analyse van de weefsels en immuuncellen, als de analyse van de *ex vivo* immuun cellen. Daarom verwachten we dat dit ook het meest positieve effect zal hebben in het infectiemodel. Het infectiemodel zullen we eerst opzetten in de muis en daarna in het varken.



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

Fase 1: Sa-Peptiden in vitro

Deze fase van het onderzoek zal in het laboratorium gebeuren met cellijnen en met primaire cellen van muizen en varkens. In deze fase zullen we vele kandidaten van sa-Peptiden testen. We zullen de sa-Peptiden in de eerste instantie testen op cellijnen. Zo kunnen we een idee krijgen van de functie van de sa-Peptiden. Het grote voordeel van cellijnen, de onsterfelijkheid, is tegelijk ook het grote nadeel. De cellijnen kunnen na verloop van tijd hun cel-specifieke eigenschappen verliezen en lijken dan meer op tumorcellen. Door de immuunmodulerende activiteit op primaire cellen te bestuderen, komen we zo dicht mogelijk bij de in vivo resultaten. Daarnaast is het mogelijk met primaire cellen om complexere kweken te bestuderen (zoals complete PBMCs). Zo kunnen we het primaire effect van de sa-Peptiden bestuderen, maar ook een mogelijke secundaire reactie op cytokine expressie die wordt geïnduceerd door de sa-Peptiden.

Zowel muizen als varkens zullen voor deze fase gedood worden, zonder dat er een behandeling is geweest. Sa-Peptiden zullen worden getest op cellen geïsoleerd uit verschillende weefsels, zoals bijvoorbeeld uit bloed, beenmerg, milt en lymfeknopen. Daarnaast zullen we de mogelijke (toxische) effecten bestuderen van verschillende formulaties en sa-Peptiden op weefselkweken van de toekomstige toedieningsroutes, bijvoorbeeld spier(cellen) en huid. In de muis is voor de meeste organen een goed protocol voorhanden over hoe de verschillende weefsels het best kunnen worden opgewerkt om zoveel mogelijk cellen uit de weefsels te kunnen isoleren en welke panelen van antilichamen gecombineerd kunnen worden voor maximale informatie. In deze fase zullen we dit herhalen in ons lab en dit ook optimaliseren voor varkensweefsels.

Fase 2: Sa-Peptiden in vivo

Fase 2a: muizen

Sa-Peptiden zullen worden toegediend aan muizen via verschillende routes (max 4), verschillende concentraties (max 3) en verschillende formulaties (max 2). Op drie verschillende tijdstippen zullen we de veranderingen van cellen in de verschillende organen meten. Hiervoor zullen we kijken naar de aanwezige cellen in de verschillende organen, bijvoorbeeld T- en B-cellen en de balans van de verschillende subtypes, bijvoorbeeld CD4 of CD8 T-cellen. Daarnaast kunnen we met behulp van SLA-II en CTLA-4 (activatie markers) bepalen of de cellen van de verschillende organen zijn geactiveerd. Bovendien kunnen we in het bloed cytokines meten, wat ook kan wijzen op activatie van de immuuncellen. Op deze manier kunnen we het effect bestuderen van de sa-Peptiden. Daarnaast zullen de cellen van de dieren die met of zonder peptide zijn behandeld ook *ex vivo* met elkaar vergeleken worden om zo zoveel mogelijk informatie te kunnen verzamelen.

Fase 2b: varkens

In de muis hebben we bepaald welke sa-Peptiden werken en wat de optimale manier van toediening is (route en formulatie). We zullen de optimale route en formulatie per sa-Pptide gebruiken en testen in het varken. We verwachten dat de formulatie en route goed translateerbaar is. Wel zullen we ook in het varken 3 concentraties testen.

Fase 3: Sa-Peptiden in vivo met infectie

WIJZIGING #8 > Er zal een pilot infectie studie met een *S.Suis* infectie muizen model, worden uitgevoerd voordat Fase 2 is afgerond, om er zeker van te zijn dat de peptiden in de muis een profylactische werking hebben.

WIJZIGING #15 > 10.1 en 10.2 g

Recent is gebleken dat de sa-Peptiden minder effect hebben in vivo op

Gram positieve bacteriën dan op Gram-Negatieve bacteriën

In de laatste fase zullen we de mate van bescherming bij infecties bestuderen. We zullen dit ook eerst in de muis doen en daarna in het varken. Hiervoor willen we infecties gebruiken die relevant zijn voor de varkenshouderijen, te denken valt onder andere aan *E. coli*, *Salmonella*, MRSA of *S. suis*. We zullen in deze fase maximaal 2 infecties selecteren. De selectie voor de infectie zullen we maken aan het eind van fase 2. We zullen de dieren eerst behandelen met de sa-Peptiden. In fase 2 hebben we de optimale route en concentratie bepaald en tevens hoe lang de werking is van de toegediende sa-Peptiden.

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

De proeven zullen gefaseerd worden uitgevoerd, eerst in de muis en daarna in het varken. Aan de hand van de beslisboom (zie boven) zal de keuze gemaakt worden of een sa-Peptide nog altijd een goede kandidaat is voor een alternatief voor antibiotica. Deze keuze is gebaseerd op zo min mogelijk negatieve effecten voor de gastheer en zo groot mogelijke (positieve) immunomodulerende effecten. We zullen een balans zoeken tussen deze optimale factoren.

Fase 1: Sa-Peptiden *in vitro*

Een grote hoeveelheid sa-Peptiden zal *in vitro* getest worden in deze fase. We zullen de sa-Peptiden in de eerste instantie testen op cellijnen. Zo kunnen we een idee krijgen over de activiteit van de sa-Peptiden. Het grote voordeel van cellijnen, de onsterfelijkheid, is tegelijk ook het grote nadeel. De cellijnen kunnen na verloop van tijd hun cel-specifieke eigenschappen verliezen en lijken dan meer op tumorcellen. Door de immunomodulerende activiteit op primaire cellen te bestuderen, komen we zo dicht mogelijk bij de *in vivo* resultaten. Daarnaast is het mogelijk met primaire cellen om complexere kweken te bestuderen (zoals complete PBMCs). Zo kunnen we het primaire effect van de sa-Peptiden bestuderen, maar ook een mogelijke secundaire reactie op cytokine expressie die wordt geïnduceerd door de sa-Peptiden.

We zullen de immunomodulerende capaciteit van de sa-Peptiden bestuderen, maar ook of de sa-Peptiden niet cytotoxisch zijn voor gastheercellen. Omdat de formulatie waarin peptiden worden toegediend veel invloed heeft op de werking van peptiden, zullen we verschillende formulaties testen. De formulaties worden getest op oplosbaarheid en werking van de sa-Peptiden en de mogelijke toxiciteit op weefsels. De formulatie alleen zal altijd mee worden genomen als controle, zodat we zeker weten dat de formulatie alleen geen invloed heeft.

We kunnen in deze fase ook de mate van transleerbaarheid van muis naar varken bestuderen, wat essentieel is in fase 2 en 3.

Fase 2: Sa-Peptiden *in vivo*

Fase 2a: muizen

Van alle sa-Peptiden die we *in vitro* hebben getest zullen we maximaal 3 sa-Peptiden selecteren om verder te testen in de muis. We zullen deze peptiden selecteren via de beslisboom eerder in deze aanvraag. Deze selectie is gebaseerd op zo veel mogelijk immunomodulerende werking en zo min mogelijk negatieve effecten voor de gastheercellen. Omdat de formulatie waarin peptiden zijn opgelost veel invloed kan hebben op de werking van sa-Peptiden, hebben we in Fase 1 verschillende formulaties getest. We zullen maximaal 2 verschillende formulaties selecteren om *in vivo* te testen. De formulaties worden geselecteerd de oplosbaarheid en werking van de sa-Peptiden en op de invloed op weefsels.

We zullen in deze fase vier verschillende routes bestuderen om de sa-Peptiden toe te dienen, intramusculair, intradermaal, subcutaan, en intra-peritoneaal. We willen dit uitgebreid doen, omdat de route en formulatie een grote invloed kan hebben op de werking van de sa-Peptiden. Daarnaast zullen we drie

verschillende concentraties van de sa-Peptiden testen, om zo de optimale dosis te bepalen. De muizen zullen op drie tijdstippen worden gedood en uitvoerig bestudeerd om zo het effect van de sa-Peptiden te achterhalen *in vivo*. We zullen het gedrag en gewicht van de muizen in de gaten houden om eventuele negatieve effecten vroeg op te kunnen vangen. Na het doden van de muizen zullen we veranderingen in samenstelling en activatiestatus van de verschillende cellypes in de verschillende organen zullen bestuderen. Daarnaast zullen we de cellen ook *ex vivo* uitvoerig testen op dezelfde manier als we bij fase 1 ook hebben gedaan.

Fase 2b: varkens

Vanuit het muismodel zullen we 1 formulatie en 1 toedieningsroute selecteren per sa-Peptide om in het varken te testen (de optimale route of formulatie kan verschillen tussen de verschillende sa-Peptiden). In fase 1 hebben we eventuele verschillen in response op de sa-Peptiden tussen muis en varken bestudeerd. Hier zullen we rekening mee houden in deze fase. We zullen kiezen voor de toedieningsroute met het grootste (positieve) effect op het immuunsysteem. Mochten meerdere routes een vergelijkbaar effect hebben, zal de voorkeur uitgaan naar intramusculaire toediening gevolgd door subcutane toediening. De reden voor deze voorkeur is dat deze toedieningsroutes eenvoudiger te implementeren zijn in de varkenshouderijen. We zullen de sa-Peptiden dus in 1 formulatie en via 1 toedieningsroute bij het varken toedienen. Wel zullen we drie verschillende concentraties testen, omdat we verwachten dat de optimale dosis kan verschillen tussen muis en varken. Daarnaast zullen we het varken in de tijd volgen door maximaal 6 keer een bloedmonster te nemen (wanneer we in de muis inderdaad indicatie hebben gevonden dat we de verwachte veranderingen ook in het bloed kunnen zien). Aan het eind (na maximaal 8 maanden) zullen we de varkens doden en op dezelfde uitvoerige manier bestuderen als bij de muis is gedaan. We verwachten dat de optimale formulatie en route van toediening vergelijkbaar zal zijn in beide diersoorten.

Fase 3: Sa-Peptiden *in vivo* met infectie

Muizen

Aan de hand van de beslisboom zullen we bepalen of de in fase 2 geteste sa-Peptiden verder getest kunnen worden in fase 3. De invloed van de peptiden op een infectie zal worden bestudeerd. In deze fase zijn klinische verschijnselen een belangrijke parameter en de dieren zullen daarom regelmatig in de gaten worden gehouden (1 tot 2 keer per dag in de cruciale fases van de infectie). Deze parameters zijn veranderingen in het gedrag van de dieren, gewicht, temperatuur en diarree. We zullen de dieren in deze fase op eenzelfde uitgebreide manier bestuderen als in fase 1 en 2. Naast deze weefsels zullen we meer facetten mee nemen in de analyse, te denken is dan aan gewicht, gedrag en lichaamstemperatuur, maar ook aan het aantal bacteriën dat kan worden terug gevonden in bijvoorbeeld de uitwerpselen of in andere organen. Daarnaast kunnen we de weefsels inbedden in paraffine en zo de weefsels uitgebreid bestuderen op pathologische kenmerken.

Varken

Wanneer we in de muis een positief effect vinden van Sa-Peptiden in het muizen infectiemodel, zullen we deze experimenten herhalen in het varken.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	In vitro studie van de sa-Peptiden (doden van muizen en varkens)
2	In vivo studie van de sa-Peptiden
3	In vivo studie van de sa-Peptiden in een infectiemodel
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : AVD108002015175
2. Titel van het project : Alternatieven voor antibiotica bij varkens
3. Titel van de NTS : Alternatieven voor antibiotica bij varkens

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer : AVD108002015175-3

5. Contactgegevens DEC

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

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 14-04-2015
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 21-08-2019
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot :
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 05-09-2019

7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.

8. Correspondentie met de aanvrager: n.v.t.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

- uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
- uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
- uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
- wettelijk vereist.

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en).

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang, omdat het onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen van een mogelijk alternatief voor conventionele antibiotica in de dierhouderij. Infectieuze ziektes komen veel voor in de dierhouderij. Om deze infecties tegen te gaan wordt op grote schaal antibiotica gebruikt. Decennialang gebruik van verschillende antibiotica op grote schaal heeft er voor gezorgd dat vele pathogenen inmiddels resistentie hebben ontwikkeld. Omdat deze pathogenen niet meer goed te behandelen zijn, vormen ze niet alleen een groot veterinair probleem, maar ook een probleem voor de volksgezondheid.

Omdat onderzoekers in een eerdere pilot hebben laten zien dat de sa-Peptiden een beschermend effect hebben bij E. coli infectie in de kip en ook in de literatuur cathelicidins zijn beschreven met een beschermend effect tegen verschillende Gram-Negatieve bacteriën, willen onderzoekers nogmaals een infectie-experiment doen om te bestuderen of de sa-Peptiden een beschermend effect hebben in het muismodel. Meer belangrijk is nog dat ze kunnen achterhalen welke biomarkers belangrijk zijn en in welke mate deze voorspellend zijn. De doelstelling van het project wijzigt verder niet.

Concreet behelst de wijziging het overzetten van 123 muizen uit bijlage 2 naar bijlage 3, waarbij 10% van deze dieren mogelijk hoger (ernstig) ongerief ervaart vanwege klinische verschijnselen. Daar staat tegenover dat onderzoekers verwachten dat hierdoor uiteindelijk veel minder dieren nodig zijn op bijlage 2 dan oorspronkelijk is vergund.

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

De DEC is van mening dat de wijziging valt binnen de gekozen strategie en experimentele aanpak en brengt geen verandering in de toetsbaarheid en samenhang van de aanvraag. Voor de opzet van het infectie-experiment verwijst de DEC naar het aanpassingsformulier van de IvD en de gewijzigde bijlage 3.

5. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:

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

De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd.

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. In de eerst bijlage is het ongerief ingeschat als terminaal omdat de dieren in deze fase van het onderzoek gedood worden zonder verdere behandeling vooraf. In de tweede bijlage zullen de dieren een sa-Peptide via één van de vier verschillende routes (intramusculair, intradermaal, subcutaan of intra-peritoneaal) toegediend krijgen, wat matig ongerief geeft. In de derde bijlage worden de dieren eerst geïnfecteerd waarna een sa-Peptide zal worden toegediend. De verwachting is dat dit bij 90% van de dieren matig ongerief veroorzaakt. Bij 10% van de dieren zal het ongerief ernstig zijn. Wanneer dit geconstateerd wordt zullen deze dieren direct uit de proef gehaald worden. Gezien de handelingen is de DEC van mening dat de ongeriefsinschattingen realistisch zijn.

Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De wijziging heeft enige invloed op de mate van ongerief die de 123 extra dieren in bijlage 3 zullen ondervinden. Voor 90% van de dieren zal het ongerief matig zijn, net zoals in bijlage 2. Maar voor 10% van de dieren kan het ongerief mogelijk ernstig zijn. Men houdt er rekening mee dat deze dieren voortijdig uit de proef genomen moeten worden, vanwege klinische verschijnselen die kunnen duiden op ernstig ongerief.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. Voorafgaand aan het onderzoek zijn de sa-Peptiden in vitro getest om een selectie te maken van de te gebruiken peptiden in vivo. Door de complexiteit van het immuunsysteem is het niet mogelijk om in vitro studies te gebruiken als infectiemodel.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De DEC is van mening dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzicht van de gekozen strategie en looptijd. In de eerste bijlage wordt gebruik gemaakt van materiaal van varkens die voor een ander experiment gedood worden. In bijlagen 1 en 2 worden surplus muizen aangevraagd om het experiment te herhalen. Door deze opzet hoeven minder dieren te worden aangevraagd. Daarnaast wordt het project gefaseerd uitgevoerd, en

wordt het verwachte verschil tussen de experimentele groepen bepaald aan de hand van de resultaten van de in vitro proeven uit de voorafgaande fase/bijlage. Het precieze aantal dieren voor bijlagen 2 en 3 zal samen met de IvD berekend worden met behulp van een Power-analyse. *Door het eerder uitvoeren van de infectieproeven in bijlage 3, kan beter achterhaald worden welke biomarkers belangrijk zijn wanneer onderzoekers alleen de sa-Peptiden aan de muizen toedienen (bijlage 2). Op deze manier kan het aantal dieren dat nodig is in bijlage 2 gereduceerd worden. Daarbij komt dat deze infectieproef geldt als no/no-go moment. Indien er geen of slechts een minimaal verschil te zien is dat duidt op een positief effect, dan zal het project gestopt worden.*

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Doordat eerst alleen de sa-Peptiden, zonder infectie, getest worden zullen mogelijke negatieve bijeffecten nauwelijks nog aanwezig zijn. De dieren kunnen extra ongerief ondervinden als gevolg van het toegediende eiwit of de infectie en zullen om die reden goed gemonitord worden. Mochten er eerder dan de geplande einddatum ernstige klinische verschijnselen optreden, dan zal het betreffende dier eerder gedood worden voor analyse om het ongerief te beperken. De dieren zullen zoveel mogelijk gezamenlijk gehuisvest worden.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op grond van de onder C genoemde overwegingen is de DEC unaniem van mening dat het belang van de doelstelling, namelijk het bestuderen van verschillende peptiden die zijn afgeleid van HDPs, om als mogelijk alternatief gebruikt te worden voor conventionele antibiotica, substantieel is en opweegt tegen het ongerief dat de dieren in dit onderzoek zullen ondervinden.

Door het toedienen van de sa-Peptide (in bijlage 2 en 3) en het infecteren van de dieren (bijlage 3) treedt weliswaar matig, en bij een kleine deel van de dieren ernstig, ongerief op, maar naar het oordeel van de DEC zijn deze handelingen noodzakelijk voor het bereiken van het gewenste doel.

Over de onderzoeksstrategie heeft de DEC onderling en met de onderzoeker uitgebreid gediscussieerd, en dan met name over de vraag of het gekozen muismodel wel de juiste is.

Onderzoeker heeft tijdens een gesprek toegelicht dat zij zich niet willen beperken tot het varken, maar een meer generieke aanpak willen hanteren, waarbij zij uiteindelijk alle landbouwhuisdieren kunnen behandelen. De muis is, volgens de onderzoeker, hiervoor een geschikt model, omdat het in de muis makkelijker zou zijn om het mechanisme in kaart te brengen omdat daar veel meer immunologisch-diagnostische hulpmiddelen voor zijn. Daarnaast heeft de DEC gediscussieerd over de vraag wat er gebeurt wanneer in de muis de gewenste effecten niet gevonden zullen worden; gaat het onderzoek in het varken dan toch verder? Onderzoeker heeft in het gesprek met de DEC aangegeven dat zij verwachten sowieso wel resultaten te vinden, maar dat het meer de vraag is

met welke peptide. De DEC gaat akkoord met de gekozen onderzoeksstrategie, maar gezien bovengenoemde discussiepunten heeft de DEC een voorwaarde geformuleerd bij haar advies. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het gebruik van de dieren, met inachtneming van de voorwaarde, in dit project gerechtvaardigd is.

De DEC is unaniem van mening dat de voorliggende wijziging een waardevolle tussenstap vormt binnen de oorspronkelijke strategie. Door nogmaals een infectieproef te doen kunnen onderzoekers achterhalen welke biomarkers belangrijk zijn en in welke mate deze voorspellend zijn. Indien er uit dit experiment geen (grote) verschillen komen die duiden op een positief effect van het sa-Peptide, dan zal het project geen verdere doorgang vinden. Hiermee wordt het onnodig gebruik van dieren beperkt.

In de ogen van de DEC is het belang, net als in de oorspronkelijke aanvraag, substantieel en weegt het op tegen het matige en mogelijk ernstige ongerief dat de dieren in dit onderzoek zullen ondervinden. De onder C genoemde overwegingen, samen met de overwegingen die voor de oorspronkelijke projectaanvraag zijn geformuleerd, brengen de DEC tot het oordeel dat het gebruik van de dieren voor deze wijziging gerechtvaardigd is.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning voor de wijziging te verlenen onder de volgende voorwaarden.

Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Universiteit Utrecht
t.a.v. Prof. dr. A. Pijpers
Postbus 80125
3508TC UTRECHT

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002015175-3

Datum 2 oktober 2019

Betreft Beslissing Aanvraag wijziging projectvergunning dierproeven

Geachte Prof. dr. Pijpers,

Op 14 augustus 2019 hebben wij uw aanvraag voor wijziging van een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Alternatieven voor antibiotica bij varkens" met aanvraagnummer AVD108002015175, waarvoor op 14 augustus 2015 een vergunning is afgegeven. Uw wijzigingsaanvraag is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer AVD108002015175-3. Wij hebben uw wijzigingsaanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij wijzen uw wijzigingsaanvraag toe. Dit betekent dat het op grond van artikel 10a, lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) is toegestaan de in de wijzigingsaanvraag beschreven dierproeven onder de vergunning voor het project "Alternatieven voor antibiotica bij varkens" uit te voeren. Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen wij tot deze beslissing zijn gekomen.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht (hierna: de DEC). Dit advies is ontvangen op 5 september 2019. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 13 september 2019 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. De aanvullingen hadden betrekking op een aangepaste Bijlage Dierproeven 3.4.4.2 en een aangepaste NTS. Uw antwoord is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

Alle hierboven genoemde stukken liggen ten grondslag aan ons besluit.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Datum
2 oktober 2019

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002015175-3

Vergunning

Uw vergunning wijzigt als volgt (wijzigingen cursief gedrukt):

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.2 In vivo studie van de sa-Peptiden	muizen	2610 2489	100% matig
3.4.4.3 In vivo studie van de sa-Peptiden in een infectie model	muizen	180 303	90% matig 10% ernstig

Voor het overige blijft de vergunning ongewijzigd.
U dient deze brief toe te voegen bij uw oorspronkelijke vergunning.

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 93118, 2509 AC, Den Haag.

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

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

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

Meer informatie

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

De Centrale Commissie Dierproeven

10.2 .e. en g

Drs. F. Braunstahl

Bijlagen

- DEC-advies



Format

Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

Rationale

Worldwide almost one billion pigs are kept for meat production and approximately two hundred million of these live in Europe. Vaccination is perhaps the single most important measure that can be taken to ensure these animals remain healthy by harnessing the pig's immune system to combat infectious diseases; thus significantly reducing the amount of antibiotics and increasing animal welfare. Therefore **10.2 e. en g** is continually working to improve its pig vaccines and where possible develop new ones that can be used all over the world. As each pathogen has its own specific mechanism of causing disease in a host and may require either humoral or cellular immunity (or both) to be controlled, new vaccines are by consequence to a large extent "tailor-made". Of course, knowledge acquired with other pathogens/ vaccines will be used to design candidate vaccines in order to increase the likelihood of success and thereby minimize the numbers of animals needed during the whole development process of a new vaccine. Vaccines can be either (components of) inactivated pathogenic microorganisms or viruses that are normally formulated together with an adjuvant and that primarily induce a humoral response, or live attenuated microorganisms or viruses that can induce both a humoral and cellular response. The attenuation of live vaccines can be accomplished by classical means (e.g. in vitro passaging or chemical mutagenesis) or by recombinant methods (GMO vaccines).

Most vaccines are given to animals that are facing the risk of being infected by a pathogen themselves but for some diseases, especially the ones that occur shortly after birth, the sow is vaccinated in order to protect its offspring by the transfer of antibodies via the colostrum and milk.

The two key requirements of any vaccine are (i) that it is safe, and (ii) that it is efficacious. As vaccination is a medical treatment that is administered to healthy individuals, then apart from perhaps some transient minor discomfort, it is important that no harm is done. With regard to efficacy, unless a vaccine can be shown to have benefit in providing protection from disease and/or infection its use cannot be justified. To demonstrate safety and efficacy of pig vaccines and to develop quality control tests, animal experiments have to be undertaken.

Vaccine development

The life cycle of veterinary vaccines can be divided into two basic phases: a research stage and a development stage. The aim of the research phase is to identify new pathogens or expand the knowledge of a known pathogen, and design and test candidate vaccines. Knowledge of the pathogen is used to assess possible protective antigens and/or live vaccine candidates that are tested in feasibility studies to investigate which level of efficacy and safety can be attained. This will indicate if a candidate vaccine can fulfil the efficacy and safety requirements that have been laid down in EU directives, the Pharmacopoeia Europaea (Ph.Eur) and guidelines and regulations of the European Medicines Agency and other international regulatory bodies.

Once the research phase has identified a vaccine candidate that can fulfil the required efficacy and safety criteria, the development phase can begin. The formulation of the potential vaccine is fixed at this point and animal studies are performed that will be part of the registration dossier that is submitted to the regulatory authorities. Several batches of the new vaccine are produced and quality controlled to commercial/regulatory standards in order to meet the requirements of the regulatory authorities by providing safety and efficacy data of these batches. Once the registration dossier has been submitted, additional studies may be requested by the regulatory authorities during the licensing procedure.

For some vaccines, registration and launch of the product is not necessarily the end of the R&D input. In some cases there is continued development and improvement to come to an updated product. This can involve improvements to production processes and/or associated QC methodologies, changes in vaccine formulation, testing compatibility with other products or novel application routes.

The current project proposal covers the research phase of new vaccine development in swine. The development phase will be covered by a separate proposal.

Swine diseases

Pig production is affected by a number of viral and bacterial diseases that in principle can be controlled by vaccination and/or antibiotic treatment.

Major viral pathogens

African swine fever virus

African swine fever (ASF) is a contagious notifiable disease of swine caused by a large and complex DNA virus (family *Asfarviridae*). The infection with ASF virus can run an acute, sub-acute, or mild course, depending on the virulence of the strain. Acute ASF is caused by virulent viruses and results in high morbidity and mortality, whereas infection with low virulent viruses can go unnoticed. ASFV is endemic in Africa, Europe, Russia, and Asia. In Europe ASFV is mostly present in the wild boar population and there the virus poses a continued risk of introducing the disease into the domestic pig herds. In Asia, the disease has run out of control since 2018 with millions of pigs that died from the disease or because they were culled. The control of the disease is severely hampered by the fact that there are no vaccines on the market. Although several attenuated live ASF vaccines have been described that provide sufficient protection against ASFV infection, they are often not safe enough. Other types of vaccines (e.g. subunit or vector-based vaccines) are much less efficacious than live attenuated virus vaccines. Therefore, research is needed to characterize and optimize live attenuated ASF vaccine candidates and also to evaluate and improve new vaccine technologies. In addition, a reliable test for the serological discrimination between vaccinated and infected animals is needed, which will aid in the control and eradication of this devastating disease.

Classical swine fever virus

Classical Swine Fever (CSF; also called Hog Cholera) is a highly contagious notifiable disease of swine caused by a member of the Pestivirus genus within the Flaviviridae family of RNA viruses. The infection with CSF virus can run an acute, sub-acute, chronic, atypical or unapparent course. Acute CSF is caused by virulent virus and generally results in high morbidity and mortality, whereas infection with low virulence virus can go unnoticed. CSFV is endemic in South-east Asia including China, Central America and South America and in parts of Eastern Europe. In the rest of Europe CSF is eradicated from the domestic pig population and a 'no-vaccination' policy is handled. In some wild boar populations CSF is still endemic and these cases pose a continuing risk of reintroduction of the disease into the free areas. Emergency vaccination programs are in place. Conventional attenuated live CSF vaccines are available and if of good quality are safe and highly efficacious. The use of these vaccines is hampered by the fact that no differentiation can be made between herds vaccinated and herds infected with CSFV and therefore these vaccines are not suited for use in eradication programs. A live attenuated marker vaccine safe for piglets and pregnant sows with an early onset of immunity after single application together with a reliable test for the serological discrimination between vaccinated and infected animals would serve as an efficient tool in the eradication approaches as wanted by governments and swine integrations.

Foot and Mouth Disease virus

Foot-and-mouth disease (FMD) is an acute, systemic, and highly contagious disease affecting cloven-hoofed mammals, including important livestock such as cattle, buffalo, swine, sheep, and goats. Typical symptoms are blisters on tongue and hooves. Not only does this cause much discomfort and secondary infections, but also fever and occasional mortality. In addition the disease causes significant economic damage as affected animals will stop moving and feeding. FMD is caused by foot-and-mouth disease virus (FMDV), which is a virus of the Picornaviridae family. To reduce the occurrence or the severity of FMD, as well as the spread of FMDV, typical measures are vaccination, selective culling, and movement restrictions. Traditional FMD vaccines are adjuvated emulsions of inactivated whole virus preparations, which induce protective levels of virus-neutralizing antibodies. Since FMDV is highly contagious, the handling of the virus and the production of vaccines needs to be performed under high-level bio-security conditions, and requires effective quality control, especially on virus inactivation. FMD vaccines need to be shipped and stored under strict cold-chain logistics, because FMDV particles are quite unstable and are readily inactivated by heat, acidity, shear, etc. This is a special handicap in the (sub-)tropical- and developing regions of the world where FMD is endemic. For SAT serotypes the notoriously low stability only yield vaccines of low protective capacity even when administered multiple times. Consequently, the development and improvement of safe, stable and effective FMD vaccines is a continued need.

Porcine Circovirus

Porcine Circovirus type 2 (PCV2) is an immunosuppressive virus and associated with a number of disease complexes (e.g. PMWS: postweaning multisystemic wasting syndrome, PRDC: porcine respiratory disease complex, PDNS: porcine dermatitis and nephropathy syndrome) which have been collectively named Porcine Circovirus Diseases (PCVD). Due to the high prevalence of PCVD with up to 100% seropositive pigs at slaughter, PCVD has become one of the most economically important diseases in the swine industry. No effective therapies exist. Vaccination against PCV2 along with good production practice

including minimizing stress and reducing co-infections is currently the only way to control this complex of diseases. Since 2007, a number of vaccines conferring either active or passive immunity have become commercially available and improvement of these vaccines (e.g. with regard to the safety profile, combination with other antigen, vaccine strain updates) is continuously ongoing.

Porcine influenza virus

Swine influenza is widespread and endemic in pig populations world-wide and is responsible for one of the most prevalent respiratory diseases in pigs. Porcine influenza is caused by the Swine Influenza virus (SIV). Based on the surface proteins hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) several influenza subtypes have been grouped. In swine, the influenza subtypes H1N1, H3N2 and H1N2 have the highest relevance. No effective therapies exist. For prevention of disease several swine influenza vaccines for intramuscular administration in gilts, sows and piglets are commercially available. However, efficacy of these vaccines is often hampered by the fact that each subtype by itself may differ antigenically. Accordingly, swine influenza vaccines used in the US or Asia are often ineffective in Europe due to a different antigenic pattern of circulating influenza subtypes. Also new strain variants may arise by antigenic shift and antigenic drift, making it necessary to regularly update currently available swine influenza vaccines. In addition, there is a constant risk that new influenza strains may arise, such as the H1N1 swine influenza strain emerging in Mexico in 2009.

Porcine Parvovirus

Porcine Parvovirus (PPV) is the most common and important cause of infectious infertility. It is world-wide in its distribution. PPV is a fairly tough virus that can persist outside the pig for many months and it is resistant to most disinfectants. It multiplies normally in the intestine of the pig without causing clinical signs. If a pig becomes infected for the first time when it is not pregnant there are no clinical signs. However, if the animal is pregnant and exposed for the first time in the first 55 days or so of pregnancy, the virus crosses the placenta killing piglets selectively. It takes 10-14 days from first infection for PPV to reach the piglets inside the uterus. If the foetus is infected at less than 35 days of age, before there has been an opportunity for bone development, death results, followed by complete absorption and ultimately a small litter is born. If infection takes place between 30 and 55 days of pregnancy the foetuses die and they become mummified. From 70 days of age the immune system of the piglet has started to develop and it can therefore respond and protect itself from the virus. Once inside the womb PPV spreads slowly from one fetus to another and as a result the sizes of mummified pigs will vary within the litter. PPV containing vaccines are indicated for the active immunization of sows and gilts to protect their embryos and fetuses against PPV infection.

Porcine Epidemic Diarrhea Virus

Porcine Epidemic Diarrhea virus (PEDV) is a positive-sense, enveloped, single-stranded RNA virus. China has seen a large increase in outbreaks since 2010 which has been attributed to the emerging of new strains, and currently PEDV is one of the main pathogens giving large economic losses in the swine industry in Asia. PEDV was for the first time introduced in the United States (US) in April 2013 and is also present in Europe. Severity of disease is variable and dependent on the epidemiologic status of the herd. In naïve animals, vomiting, acute watery diarrhea, and loss of appetite in pigs of all ages can be observed; morbidity approaches 100 percent. Particularly suckling pigs are very susceptible, and they typically display watery diarrhea, dehydration, and metabolic acidosis with mortality typically between 50 and 80 percent. On the other hand, feeder and grower pigs display diarrhea, anorexia, and depression with high morbidity, but low mortality (1-3 percent). Pregnant females will require approximately three weeks to develop sufficient maternal antibodies to protect their litter from the PED virus. Piglets will need to ingest sufficient amounts of colostrum for the immunity to be protective. Current commercial PED vaccines produced in Southeast Asia do not induce effective lactogenic immunity to the Chinese-like PEDV.

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) is a viral disease in swine that is endemic in nearly all swine-producing countries responsible for large economic losses. Two major types of PRRS virus can be identified: the European type strains (Type I) and the North American type strains (Type II), with both genetic and antigenic differences. Two major clinical manifestations of the disease are described from the field: respiratory problems in pigs of all ages and severe reproductive failure in sows and gilts characterised by late-term abortions and increased number of stillborn, mummified and weak-born piglets. PRRSV functions as an important primary pathogen in the Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) of young piglets. A variety of modified live vaccines (MLV) and inactivated vaccines

against both genotypes of virus are available. It is commonly agreed upon that immunity after vaccination with MLV is more effective compared to vaccination with killed vaccines. PRRSV is a small positive-strand RNA virus belonging to the family of Arteriviridae that possesses a pronounced capacity to mutate and to recombine. These characteristics are considered to contribute to the selection of viruses in the field that can possess enhanced virulence and fail to be neutralized by prior vaccination. There is a constant request for improving and updating current vaccines.

Pseudorabies (Aujeszky's disease) virus

Aujeszky's disease is a contagious virus disease of swine of major economic importance in many parts of the world mostly in pig dense areas. The disease is caused by an alphaherpesvirus named Aujeszky's disease virus (ADV) or Pseudorabies virus (PRV). Pigs are the primary host for PRV, although a large range of animals can be infected. Infection of non-porcine species usually is lethal (Aujeszky's disease is not a zoonosis). Through the successful use of marker vaccines in eradication programs PRV has been eradicated from the domestic pig population in several major pig producing countries in the EU and in Canada and the US. Vaccination against PRV in these countries is forbidden while countries in Asia and South America are still suffering from the consequences of PRV infections. But also in countries where PRV was eradicated the virus can still pose a threat because it is still endemic in the wild boar population. As a consequence of the non-vaccination policy reintroduction of a wild type PRV in the domestic pig population could be disastrous because the entire pig population in these countries will be naïve and therefore unprotected. Especially infection with PRV at a young age when piglets are not protected via maternally derived antibodies from their dams will lead to high morbidity and high mortality. In case of emergency there is the need for a marker vaccine that can be used in naïve animals of all ages (herd vaccination).

Major bacterial pathogens

Actinobacillus pleuropneumoniae

Pleuropneumonia is a widely spread infectious disease in pigs, with serious economic consequences. The etiological agent is *A. pleuropneumoniae* (App), and the most important effects of this infection are a high mortality and high costs of veterinary treatments. Antibiotic therapy is only effective in the early phase of the infection. Therefore, App infections on the farm cannot be eliminated by antibiotics. Asymptomatic carriers (with App in lung abscesses or tonsils) are a source of (re)infection. Chronically infected farms are advised to vaccinate purchased animals against App prior to introduction into the farm. Inactivated vaccines are available, but they generally induce substantial systemic reactions after vaccination and provide suboptimal protection.

Bordetella bronchiseptica

B. bronchiseptica infects the nose and upper respiratory tract of pigs and can cause mild (reversible) conchae atrophy, but is also associated with bronchopneumonia in young pigs. It facilitates colonization of the nasal mucosa by *P. multocida* type D1 strains that produce a toxin that interferes with bone formation in the snout. By vaccination of pregnant sows, *B. bronchiseptica* problems in young piglets can be prevented, but there is no vaccine to protect against bronchopneumonia after weaning.

Clostridium perfringens

Neonatal piglet diarrhea, diarrhea that occurs during the first week of a piglet's life, is world-wide the leading cause of piglet loss in the pre-weaning period. The major pathogens involved are *E. coli* and *C. perfringens*. *C. perfringens* type C, which causes necrotic enteritis, is perceived to be a bigger problem in the field than *C. perfringens* type A, which in general only causes a mild form of diarrhea. Sow vaccination is used to control necrotic enteritis, but combination products that also protect against *C. perfringens* type A diarrhea are not available.

Erysipelas rhusiopathiae

E. rhusiopathiae is the cause of swine erysipelas, an economically important disease worldwide. It is manifested as acute or subacute septicaemia and by chronic proliferative skin lesions. The acute form is characterized by typical rhomboid (diamond-shaped) urticarial lesions and fever, whereas the chronic form is characterized by arthritis. In addition, infections of pregnant gilts and sows with the zoonotic agent *E. rhusiopathiae* can result in fetal death and abortions. A combination product with PPV has been very successful in preventing reproductive problems in sows.

Escherichia coli

E. coli is part of the normal flora of the lower intestine, but enterotoxigenic strains that express F4, F5 or F6 fimbriae are able to colonize the jejunum and the ileum and cause neonatal piglet diarrhoea. Furthermore, F4 and F18 positive strains can induce diarrhoea shortly after weaning and shiga toxin-producing strains can cause edema disease. There are vaccines for the individual diseases caused by *E. coli*, however, combination products that (cross)-protect against two or more forms are not available.

Haemophilus parasuis

H. parasuis, the causative agent of Glässer's disease, is present on the majority of pig farms worldwide. The infection is mostly subclinical, but *H. parasuis* can act as an opportunistic pathogen, especially on farms with a high health status. The disease is characterised by acute poly-arthritis, pleuritis, pericarditis and peritonitis, mainly in young pigs at times of stress such as occurs at weaning, mixing and moving. Severity of the disease is serotype-dependent, but during outbreaks on farms that were previously *H. parasuis* negative, mortality in young piglets can be as high as 60%. Most disease is caused by serotype 5 but in some countries a significant proportion is caused by type 4. Other serotypes most prominently implicated are 1, 12, 13 and 14. Inactivated vaccines containing one or two serotypes are used to passively protect young piglets by sow vaccination and older piglets by direct vaccination of the animals at risk.

Lawsonia intracellularis

The intracellular bacterium *L. intracellularis* is the cause of proliferative enteropathy. The chronic form (Porcine Intestinal Adenomathosis - PIA) affects growers/finishing pigs and is associated with mild diarrhoea, weight loss and increased body weight variation. A typical presentation of the chronic form is sub-clinical Ileitis which can be defined as an infection with *L. intracellularis* in the absence of clinical signs of the disease such as mortality and diarrhoea. The acute form manifests itself frequently as fatal hemorrhagic diarrhea that often occurs in late finishers or gilts freshly being introduced into the breeding herd (Porcine Hemorrhagic Enteropathy - PHE). The disease is widespread and occurs worldwide with high economic losses. Currently, only a live attenuated vaccine with limited efficacy is available.

Leptospira

Infections of pregnant animals with *Leptospira* can result in fetal death and/or abortion depending on the serovars involved. The most prevalent serovars are Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippothyphosa, Australis, Pomona and Tarassovi. No vaccines against swine Leptospirosis are available in the EU.

Mycoplasma hyopneumoniae

M. hyopneumoniae is the causative agent of Enzootic Pneumonia and one of the most important primary pathogens in the Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) occurring in growing and finishing pigs. It is a first invader of the lung, predisposing the lung for infections with secondary pathogens. The prevalence of *M. hyopneumoniae* has reached almost 100% in the pig production in industrialized countries and vaccination coverage is more than 70%. Vaccines induce only partial protection and there is a need for improved vaccines that can be used in combination with others to be given to young pigs.

Pasteurella multocida

Atrophic rhinitis (AR) is a disease of young pigs that is caused by toxinogenic *P. multocida* type D1, mostly in association with *B. bronchiseptica*. The disease is characterized by severe conchae atrophy in the nose, snout deformation and nose bleeds accompanied by higher susceptibility to secondary infections and reduced growth. Economic losses of affected farms are generally high because of the poor performance of the pigs and the high antibiotic usage needed because of the frequent secondary infections. *P. multocida* type A strains can be the causative agent of pneumonia and pleuritis. Vaccination against AR is possible, but there are no vaccines against pneumonia caused by type A strains.

Streptococcus suis

S. suis has been recognized as the causative agent of a number of clinical pictures in swine, including rhinitis, bronchopneumonia, arthritis, meningitis, pericarditis, endocarditis, poly-serositis and septicemia. Clinical disease can be acute (with sudden death) or chronic (with lameness and/or residual symptoms of the central nervous system). Particularly acute outbreaks can cause severe economic losses. Morbidity ranges from 1% to 50%, and mortality from 0% to 20% (despite antibiotic therapy still 10% mortality can occur). The recovery rate after antibiotic treatment is usually not 100%, even after early treatment, and antibiotic resistance in *S. suis* has already been observed.

S. suis not only occurs in swine, but has also been isolated from cats, horses, humans (several outbreaks in China) and ruminants, all of which exhibited clinical disease. At the moment 35 serotypes of *S. suis*

are known. Worldwide serotype 2 is the most prevalent one and is the most common serotype found in diseased pigs. Most cases of clinical disease caused by serotype 2 are seen in pigs aged 4-12 weeks, with a peak incidence just after weaning. More recent literature shows that in Europe also serotypes 1, 7 and 9 are important. These four serotypes together cover approximately 80% of all *S. suis* infections in Europe. There are no vaccines on the market that protect against more than one serotype.

Minor pathogens and new diseases

Besides the pathogens listed above, a number of bacterial and viral diseases are considered to be of less importance because of milder clinical signs or limited geographical spread. Examples of these are African Swine fever virus, Hepatitis E virus, Porcine Rotavirus, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Clostridium difficile*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus hyicus*. However, it cannot be excluded that some of these pathogens might be able to cause significant disease in pigs and problems to the swine industry by enlarging their geographical spread, by an increase in virulence or changes in pig management conditions (e.g. reduction of antibiotic usage). In addition, novel pathogens that cause large epidemics can emerge. Good examples of pathogens that have emerged during recent years are the PRRS virus and Circovirus that first appeared in the late 1980s and early 1990s, respectively. Recently, [10.2 e. en g] scientists were among the first to discover a new virus that is associated with [10.1 c en 10.2 g]. Furthermore, [10.1 c en 10.2 g] that can have direct negative effects on a pig's health or can have immunomodulating properties that interfere with an effective response to vaccination against other diseases. Therefore, protection against [10.1 c en 10.2 g] is a new area of interest to [10.2 e. en g].

Current products

[10.2 e. en g] has a wide range of vaccines against most of the major pathogens: [10.1 c en 10.2 g].

In addition, a number of combination products have been developed: [10.1 c en 10.2 g].

R&D projects and historical progress

Work carried out during the last five years has been successful in bringing a number of new products to the market [10.1 c en 10.2 g].

Furthermore, progress has been made in developing a combination vaccine against [10.1 c en 10.2 g].

[10.1 c en 10.2 g], and work on new (combination) vaccines against [10.1 c en 10.2 g] [10.1 c en 10.2 g] was started. In addition, studies were undertaken to show compatibility of existing and new products to be able to give sound advice on the vaccination schedules to be used in the field and to obtain label claims for associated use, i.e. mixing or application of two or more vaccines at the same time.

Whereas one could argue that no further work is needed once a vaccine against a certain pathogen has been developed, in reality the optimization of the [10.2 e. en g] vaccine range is a continuous process. [10.2 e. en g] aims to improve its products to become more efficacious, have fewer side-effects, make the application more practical and better adopted to current animal production technologies, less stressful for the animal and more cost-effective. For instance, combination vaccines reduce the number of injections that have to be given to pigs and are therefore adventitious from an animal welfare as well as from a farm management perspective. Development of new and/or improved combination vaccines that are compatible with current products [10.2 e. en g] is one of the main focusses of the [10.2 e. en g] swine R&D program. In addition, [10.1 c en 10.2 g] vaccination is an application method that also has benefits from an animal welfare and customer perspective and [10.2 e. en g] is trying to add new products to its current line of [10.2 e. en g] vaccines.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

The goal of the project is to update the current **10.2 e en** vaccine portfolio in response to unmet needs in the field of pig livestock industry. More specifically, the aim is to identify new pathogens, expand the knowledge of known pathogens to be able to develop new (combination) vaccines and test candidate vaccines against these pathogens. The outcome of a successful research phase is the discovery of a new pathogen and/or a prototype vaccine that has shown to be safe and efficacious in pigs (proof of concept). In addition, (antigenic components of) the pathogens will be used to immunize laboratory animals to generate antibodies that can be used to set up immunological assays for the detection and/or quantification of the antigen/pathogen (e.g. ELISAs, serotyping tests, immunohistochemistry).

3.3 Belang

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

Vaccines are the most effective method for prevention or eradication of diseases. Further improvement and extension of the available vaccine range will bring safer, more efficacious vaccines, including vaccines against emerging diseases. Also, combinations of diseases can be encountered more effectively, with fewer vaccination moments (injections), when vaccines are developed that can be used at the same time or mixed with other vaccines, or even in ready to use combination products.

The prospects are that the new vaccines will further reduce animal suffering and the use of antibiotics, and will lead to reduced losses in meat production and thereby to a more economical use of natural resources.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

To show that a (newly isolated) microorganism or virus is pathogenic, pig infection studies have to be undertaken to fulfil Koch's postulates. These infection studies form the basis for a pig infection model that will be used to test the efficacy of vaccine candidates (vaccination-challenge studies). Such an infection model is needed to be able to show that a vaccine is capable to prevent or significantly reduce infection and/or clinical signs. For vaccines against some pathogens, the infection model that has to be used and the specific efficacy criteria that have to be fulfilled are prescribed in a monograph of the Ph.Eur. When doing vaccination-challenge studies, it is attempted to find an immunological correlate of protection, so that in further studies efficacy can be evaluated on the basis of e.g. the serological response after vaccination instead of challenge.

Safety of vaccine candidates has also to be evaluated in pigs to show that systemic and local (injection site) reactions after vaccination, if any, are acceptable. For each new vaccine, a risk-benefit analysis has to be made and the aim is to induce as little as possible discomfort by vaccination.

In the research phase, safety and (serological) efficacy parameters are measured in combined orientating efficacy and safety studies.

Central in the research on a completely new or improved vaccine is the product profile that is determined before the experimental work is started. The product profile describes the safety and efficacy criteria that have to be met in order to achieve an acceptable risk-benefit profile. In case the available vaccine candidates show insufficient efficacy or safety, research is terminated. This approach is identical for new and improved products, but for improved products the aim will be to have a better product profile than that of the current product(s) on the market.

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

The research phase for the development of a new vaccine will consist of one or more of the following types of animal experiments (described in detail in appendices 1 through 3).

1. An infection model for a pathogen will be developed based on the scientific literature or a Ph.Eur monograph (if available) and the experience with other pathogens within the company. In a model, it will be attempted to reproduce the clinical signs that are associated with a certain disease or syndrome. For a potentially new pathogen this will reveal if it is indeed able to induce disease (Koch's postulates). For known pathogens a model will allow assessment of the efficacy of vaccine candidates under controlled laboratory conditions as described in Ph.Eur 5.2.7 (Evaluation of efficacy of veterinary vaccines and immunosera) or vaccine specific monographs, EU Directive 2009/9/EC amending Directive 2001/82/EC (Community code relating to veterinary medicinal products) and national guidelines and regulations outside the EU. New infection models are defined as models for newly discovered (potential) pathogens or published models that have not been used within [redacted] before. Improvement or refinement of existing models will be undertaken in case not all disease characteristics that are relevant for the field situation are presented in the model, or if the model shows a high variability in the level of infection/pathology within a group of infected animals and which would therefore necessitate the inclusion of large groups of animals in infection-challenge experiments in order to be able to show statistically significant differences. Testing of new serotypes/pathotypes of a pathogen is also considered improvement rather than development of a new model, as the route of application etc. will be based on experience present within the company. Furthermore, refinement will also include the testing of modifications to a model with the intention to increase animal welfare (e.g. a less invasive application method).

Studies to develop/improve an infection model will have the following set-up:

- Selection of specific animal type (age, biological/immunological status)
- Administration of a (potential) pathogen
- Observation of clinical signs post infection/sampling (e.g. for shedding of the pathogen)
- Necropsy to investigate (histo)pathological changes

The degree of discomfort will depend on the nature of the pathogen involved as the infection model is supposed to mimic the natural disease as much as possible.

2. Once an infection model has been established, the efficacy of candidate vaccines against a pathogen can be evaluated. When looking into the options for vaccination against a newly discovered pathogen or a pathogen for which no vaccine is available, the vaccine candidate(s) to be tested are based on the scientific literature and the knowledge within the company on pathological processes, immune mechanisms and vaccines against related pathogens to have the biggest chance of success and thereby minimize the number of animals needed. This will determine whether a live or inactivated vaccine approach will be taken. In some instances, there will be collaboration with outside partners (e.g. universities) that have specific knowledge on a (new) pathogen and that might even already have prepared and tested vaccine candidates. In addition, research on new (combination) vaccines for pathogens that are already being controlled by vaccination will also be guided by the experience gained under field conditions with the marketed product(s). An inactivated vaccine can be a whole killed microorganism or virus, or an immunogenic part of the pathogen (subunit vaccine). Also DNA vaccines or vaccines containing non-replicating virus particles fall into this category. An inactivated vaccine will be formulated with an adjuvant that is expected to be safe in pigs in combination with the chosen antigen(s) and will be quality control tested (e.g. for pH and sterility) before the start of an animal experiment to reduce the chances of unwanted vaccination reactions. A live vaccine is an attenuated form of the pathogen that has been prepared by "classical methods", such as laboratory passage or chemical mutagenesis, or by targeted gene modifications with the help of recombinant-DNA techniques. A live vaccine candidate will be genetically characterized and tested for purity before the start of in vivo studies. In vaccination-challenge studies using the infection model, it will be evaluated whether a vaccine can provide the required protection against the pathogen in terms of reduction of infection, clinical signs and (histo)pathology. Only if a vaccine is able to statistically significantly reduce one or more aspects of a disease or fulfil the efficacy criteria specified in a Ph.Eur monograph, it can be considered for regulatory approval. By studying the immune response after vaccination, it will be attempted to find a correlation between the height of the immune response (e.g. as measured in in vitro virus-neutralization) and protection in the pig. In those instances where such a correlation can be established, candidate vaccines can be tested on the basis of that response instead of by challenge infection. However, although some vaccines are able to protect against the disease in question, the immune response measured (if any) is not always indicative of the level of protection, especially in case protective antigen(s) are unknown or protection is based on cellular immunity. If no correlate of protection is available, vaccine efficacy can only be evaluated in vaccination-challenge studies.

To be able to make a proper risk-benefit analysis for a new product, all vaccines have to be tested in safety studies in the target animal (Ph.Eur 5.2.6 (Evaluation of safety of veterinary vaccines and immunosera), EU Directive 2009/9/EC amending Directive 2001/82/EC (Community code relating to veterinary medicinal products) and national guidelines and regulations). Inactivated and subunit vaccines usually contain an adjuvant that enhances the immune response to the antigen(s) in the vaccine. Unfortunately, although the adjuvant preparations themselves can be considered safe, the combination of antigen and adjuvant sometimes results in unwanted systemic and/or local reactions after vaccination. Therefore, for each new inactivated or subunit vaccine the effect on the animals' general health, determined by observing clinical signs (e.g. general demeanour, body temperature, appetite etc.) and injection site reactions has to be determined. For an attenuated live vaccine, it has to be shown that it is unable to induce disease. Therefore, live vaccine candidates will be evaluated for their lack of virulence in the infection model. Testing specific gene-deleted mutants in the infection model will also provide knowledge on which antigens are required for pathology and/or survival within the host. These antigens can then be considered for an inactivated vaccine approach.

As evaluation of the safety and efficacy of vaccination will be combined in the research phase, studies will be performed according to the following basic set-up (infection will not be performed in case an immunological marker for protection can be monitored):

- Administration of a candidate vaccine
- Observation of clinical signs post vaccination
- Monitoring responses (e.g. blood sampling)/persistence (e.g. shedding) in case of a live vaccine
- Infection with a pathogen
- Observation of clinical signs post infection/sampling (e.g. for shedding of the pathogen)
- Necropsy to investigate (histo)pathological changes

The degree of discomfort encountered directly as a result of vaccination and sampling is small and such procedures are routinely used in normal veterinary care. The one area in which a moderate to severe degree of suffering may occur is after the onset of clinical disease following infection.

3. To set-up assays that can help to detect a pathogen (e.g. by immunohistochemistry), discriminate between different strains (e.g. serotyping) or develop immunological assays to quantify whole pathogens or specific antigens (antigenic mass and potency tests) it may be necessary to use laboratory animals for the preparation of sera or monoclonal antibodies if the required reagents are not available. For each new vaccine, batch tests for the quantification and identification of the active ingredients are required under EU Directive 2009/9/EC amending Directive 2001/82/EC (Community code relating to veterinary medicinal products) and Ph.Eur 0062 (Vaccines for veterinary use) to verify the consistency of the manufacturing process and the final product. Preferably, in vitro tests are used for batch testing, but in case an in vitro batch potency test is not possible for a new vaccine, a serological assay in laboratory animals will have to be set up. In addition, for some vaccines for which a Ph.Eur monograph exists, a mandatory batch potency test in laboratory animals is described. In such cases, a prototype vaccine will be tested in that assay to determine compliance with the monograph.

Immunization experiments of laboratory animals will generally be as follows:

- Administration of antigen/pathogen
- Collection of blood

As laboratory animals are only used to prepare serum, discomfort will be mild or moderate depending on the number of injection/sampling moments.

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

To test the feasibility of vaccine development against a (new) pathogen, the sequence of experiments is the following:

1. It is attempted to set up an infection model.

If a potential pathogen fails to fulfil Koch's postulates, vaccine development will stop, and without an infection model for a known pathogen efficacy experiments cannot be undertaken unless there is already a known correlate of protection. Once an infection model is available the next step can be undertaken:

2. Perform orientating safety/efficacy study.

This may take several rounds of experiments to test a number of vaccine candidates. Once a candidate vaccine has proven to be able to fulfil the required efficacy and safety criteria, the research phase stops

and the new prototype vaccine can move to the development phase. If, with the knowledge available, it is impossible to produce a candidate vaccine that fulfils the criteria, further development is stopped.

3. Studies in laboratory animals for assay development.

These will only be undertaken if the right immunological reagents are not (commercially) available. Potency testing in laboratory animals (according to Ph.Eur monographs) will only be done in case a prototype vaccine has been shown to be safe and efficacious.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Development / improvement of infection models in pigs
2	Orientating safety / efficacy studies in pigs
3	Studies in laboratory animals for assay development
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	