

| Inventaris Wob-verzoek W23-03 |  | wordt verstrekt |      |        |       | weigeringsgronden |             |             |             |            |
|-------------------------------|--|-----------------|------|--------|-------|-------------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| nr.                           | document NTS 202114785   | reeds openbaar  | niet | geheel | deels | 5.1, lid 1c       | 5.1, lid 2e | 5.1, lid 2f | 5.1, lid 2h | 5.2, lid 1 |
| 1                             | Aanvraag projectvergunning   |                 |      |        | x     |                   | x           |             | x           |            |
| 2                             | Projectvoorstel bij aanvraag   |                 |      |        | x     |                   |             |             | x           |            |
| 3                             | Bijlage dierproeven 1 bij aanvraag   |                 |      |        | x     |                   |             |             | x           |            |
| 4                             | Bijlage dierproeven 2 bij aanvraag   |                 |      |        | x     |                   |             |             | x           |            |
| 5                             | NTS bij de aanvraag  |                 |      | x      |       |                   |             |             |             |            |
| 6                             | E-mail aan DEC om advies projectvergunning, d.d. 12-04-2021                        |                 |      |        | x     |                   |             |             | x           |            |
| 7                             | DEC-advies, d.d. 19-8-2021   |                 |      |        | x     |                   | x           |             | x           |            |
| 8                             | Projectvoorstel na DEC advies  |                 |      |        | x     |                   |             |             | x           |            |
| 9                             | Bijlage dierproeven 1 na DEC advies  |                 |      |        | x     |                   |             |             | x           |            |
| 10                            | Bijlage dierproeven 2 na DEC advies  |                 |      |        |       |                   |             |             | x           |            |
| 11                            | NTS na DEC advies  |                 |      | x      |       |                   |             |             |             |            |
| 12                            | Adviesnota aan CCD, d.d. 30-8-2021 met opmerkingen                                 |                 |      |        | x     |                   | x           |             | x           | x          |
| 13                            | Adviesnota aan CCD, d.d.03-09-2021   |                 |      |        | x     |                   | x           |             | x           | x          |
| 14                            | E-mail CCD aan vergunninghouder over projectvergunning, d.d. 13-09-2021            |                 |      |        | x     |                   | x           |             | x           |            |
| 15                            | Reactie vergunninghouder op vragen CCD, d.d. 20-9-2021                             |                 |      |        | x     |                   | x           |             | x           |            |
| 16                            | Projectvoorstel na CCD advies  |                 |      |        | x     |                   |             |             | x           |            |
| 17                            | Bijlage dierproeven 1 na CCD advies  |                 |      |        | x     |                   |             |             | x           |            |
| 18                            | Bijlage dierproeven 2 na CCD advies  |                 |      |        | x     |                   |             |             | x           |            |
| 19                            | NTS na CCD vragen  |                 |      | x      |       |                   |             |             |             |            |
| 20                            | Adviesnota aan CCD, d.d. 24-9-2021 met opmerkingen                                 |                 |      |        | x     |                   | x           |             | x           | x          |
| 21                            | Adviesnota aan CCD, d.d. 24-9-2021   |                 |      |        | x     |                   |             |             | x           | x          |
| 22                            | E-mail CCD aan vergunninghouder over projectvergunning, d.d. 24-09-2021            |                 |      |        | x     |                   | x           |             | x           |            |
| 23                            | Reactie op vragen CCD, d.d. 20-9-2021  |                 |      |        | x     |                   | x           |             | x           |            |
| 24                            | NTS na CCD vragen en definitieve versie  |                 |      | x      |       |                   |             |             |             |            |
| 25                            | Adviesnota aan CCD, d.d. 01-10-2021  |                 |      |        | x     |                   | x           |             | x           | x          |
| 26                            | Beschikking d.d. 01-10-2021  |                 |      |        | x     |                   | x           |             | x           |            |
| 27                            | E-mail CCD, terugkoppeling aan DEC over aanvraag projectvergunning, d.d. 12-04-022 |                 |      |        | x     |                   | x           |             | x           |            |

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

## 1 Gegevens aanvrager

|     |   |  |  |
|-----|---|--|--|
| 1.1 | Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?<br>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.                       | <input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in<br><input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen | 5.1 lid2h  |
| 1.2 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.   | Naam instelling of organisatie<br>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde<br>KvK-nummer                            | 5.1 lid2h<br>5.1 lid2h<br>5.1 lid2h  |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in. Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker. | Straat en huisnummer<br>Postbus<br>Postcode en plaats<br>Iban<br>Tenaamstelling van het rekeningnummer                         | 5.1 lid2h  |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker   | (Titel) naam en voorletters<br>Functie<br>Afdeling<br>Telefoonnummer<br>Email adres  | 5.1 lid2e<br>onderzoeker<br>5.1 lid2e<br>5.1 lid2e<br><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| 1.5 | (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.   | (Titel) naam en voorletters<br>Functie<br>Afdeling<br>Telefoonnummer<br>Email adres  | 5.1 lid2e<br>onderzoeker<br>5.1 lid2e<br>5.1 lid2e<br><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| 1.6 | (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon  | (Titel) naam en voorletters  | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.   |

die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

Functie  
Afdeling  
Telefoonnummer  
Email adres

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?  
 Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag  
 Nee

## 2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?  
 Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3  
 Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het Dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2

- Wijziging op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het Dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

- 2.3 Is dit een wijziging voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?  
 Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier  
 Nee > Ga verder met vraag 3

- 2.4 Is dit een melding voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?  
 Nee > Ga verder met vraag 3  
 Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en Startdatum  
einddatum van het project?  
1-2-2021  
31-1-2026
- 3.2 Wat is de titel van het project?  
Development of a Hepatitis E genotype 3 animal model and use in vaccine and treatment studies in pigs
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?  
Ontwikkeling van een Hepatitis E genotype 3 diermodel voor vaccinatie en interventiestudies in varkens

|     |  |                                      |           |
|-----|--|--------------------------------------|-----------|
| 3.4 | Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt? | Naam DEC<br>Postadres<br>E-mailadres | 5.1 lid2h |
|-----|--|--------------------------------------|-----------|

#### 4 Betaalgegevens

|     |   |   |
|-----|---|---|
| 4.1 | Om welk type aanvraag gaat het?   | <input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning €   |
| 4.2 | Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer. | <input type="checkbox"/> Wijziging €<br><input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso<br><input checked="" type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur |

#### 5 Checklist bijlagen

|     |                              |  |
|-----|------------------------------|--|
| 5.1 | Welke bijlagen stuurt u mee? | Verplicht<br><input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel inclusief Description animal procedures (DAP)<br><input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting |
|     |                              | Overige bijlagen, indien van toepassing<br><input type="checkbox"/> Melding Machtiging<br><input checked="" type="checkbox"/> inkooporder 5.1 lid2h                                |

#### 6 Ondertekening

|     |  |   |
|-----|--|---|
| 6.1 | Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar: | Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart: <ul style="list-style-type: none"> <li>• dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.</li> <li>• dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.</li> </ul> |
|-----|--|---|

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

5.1 lid2e

Functie

gemandateerd vergunninghouder

Plaats

5.1 lid2h

5.1 lid2e

Datum

Handtekening



**Form**

**Project proposal**• This form should be used to write the project proposal of animal procedures.

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

**1 General information**

|  |   |
|--|---|
| 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 5.1 lid2h   |
| 1.2 Provide the name of the licenced establishment.  | 5.1 lid2h   |
| 1.3 Provide the title of the project.  | Development of a Hepatis E genotype 3 animal model and use in vaccine and treatment studies in pigs |

**2 Categories**

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

**3 General description of the project**

### 3.1 Background

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

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

Hepatitis E virus (HEV) is an important cause of outbreaks and sporadic cases of viral hepatitis in humans in many developing tropical and subtropical countries. HEV infections in humans can vary from asymptomatic or mild disease with fever and nausea to acute hepatitis with symptoms indistinguishable from other types of acute viral hepatitis. HEV is the most important cause of clinical hepatitis in adults throughout Asia and in some European countries. It is estimated that two billion people have been infected with HEV with 14 million symptomatic cases and 300,000 deaths occurring annually around the world [1, 2] [3, 4]. The disease resulting from HEV infection occurs often in pregnant women and is characterized by moderately severe hepatitis that is self-limiting in most patients. However, in immune-compromised individuals, HEV can persist and cause chronic liver disease.

HEV is a positive-stranded RNA virus, which is the sole member of the genus *Hepevirus* in the family of *Hepeviridae*. HEV is a small, round non-enveloped particle of 27-34 nm with a genome approximately 7.2 kb in length. Based on the extensive genomic variability among HEV isolates, HEV sequences have been classified in four major genotypes (1, 2, 3 and 4), all belonging to a single serotype. The different HEV genotypes show a distinct geographical distribution. Genotypes 1 and 2 (HEV 1 and HEV 2) are restricted to humans and are prevalent in developing countries. Genotypes 3 and 4 (HEV 3 and HEV 4) are distributed worldwide, have a much wider host range and are considered to be zoonotic. Clinical cases of HEV in industrialized countries are increasingly caused by zoonotic genotypes HEV 3 and HEV 4 [5].

Many swine HEV isolates have been identified in both developing and industrialized countries. HEV 3 occurs worldwide, whereas HEV 4 is mainly seen in Asia. Although direct evidence of HEV transmission from humans to animals is lacking, both human and swine genotype 3 strains were experimentally demonstrated to infect pigs and there is a high level of genetic relatedness between HEV isolates obtained from humans and swine [6, 7]. In pigs, HEV infection occurs through the fecal-oral route and the virus first replicates in the gastrointestinal tract and subsequently spread systemically to the liver [8]. After replication in the liver, swine HEV is released to the gallbladder from hepatocytes and is then excreted in feces. Replicative negative-strand HEV RNA was detected in the liver, intestines and lymph nodes of experimentally infected pigs and viral RNA was detected in hepatocytes. There were no remarkable gross lesions and also in natural conditions pigs do not develop any signs of disease. The microscopic pictures were characterized by mild-to-moderate multi-focal lymphoplasmacytic hepatitis and mild focal hepatocellular necrosis [8].

Despite a growing awareness, hepatitis E virus (HEV) remains understudied and investigations have been historically hampered by the absence of efficient cell culture systems to obtain virus isolates, which can be used more standardized in animal studies. Due to this limitation, experimental infections are using infectious tissue or excretion materials from infected animals, which also limits comparative studies between virus strains. As a result, the pathogenesis of HEV infection and basic steps of the HEV life cycle are poorly understood. Major efforts have recently been made through the development of HEV infectious cDNA clones and cellular systems that significantly advanced HEV research [9]. The use of reverse genetic systems has demonstrated the generation of infectious virus from cloned cDNA by transfection of cultured cells and also in animal models. In pigs, the intrahepatic administered infectious clone of a human HEV 4 isolate resulted in a successful infection with subsequent RNA detection of HEV in the period after challenge [10].

Several animal species are susceptible to infection by human HEV strains and are used in animal studies. Based on transmission studies, rhesus monkeys and cynomolgus monkeys are considered the most suitable models for HEV studies [4]. However, despite production of efficient virus replication, nonhuman primate have limitations in reproducing the clinical and pathological aspects of hepatitis. Furthermore, limited animal resources, cost, and ethical considerations have limited the widespread use of nonhuman primate models in HEV research today. HEV can naturally infect pigs

and therefore pigs are considered as one of the primary animal models for HEV infections in biomedical studies and are at the same time useful in target animal studies.

Although for humans, who are at risk, vaccination might be a critical tool to prevent infection. So far only one, in China registered HEV vaccine is available. This is a subunit vaccine based on the capsid protein of HEV 1 [11, 12]. In the veterinary field vaccination is considered a potentially successful approach to reduce the incidence of HEV in the pig population and reduce the zoonotic risk [12-14]. After natural infection, humans and also pigs develop HEV specific antibodies and also after vaccination with the Chinese vaccine antibodies are elicited and efficacy has been shown against HEV 4. The current vaccine effectively protects against symptomatic HEV 4 infection, however, protection is dependent on the height of the IgG titre and the duration of immunity post vaccination is limited [15]. Efficacy of the vaccine against HEV 3 is unknown. Thus new vaccines with a high and long-lasting efficacy against in Europe predominant HEV 3 infections are needed. Current therapeutic options against HEV are limited to one unspecific antiviral, Ribavirin and cytokine treatments. Treatment with Ribavirin is off -label use and in only a limited number of patients successful. Therefore, therapeutic tools or HEV-specific antivirals to treat infections are missing and an animal model can be essential for ultimate testing the efficacy of the urgent needed new drugs in HEV 3 therapy.

In conclusion, a readily available animal model to study the underlying mechanism of acute hepatitis after HEV 3 infection is still lacking. With such a reproducible model of HEV new vaccine candidates for humans and pigs will be tested, and also used for evaluating the efficacy of antivirals and therapeutics against HEV infections in humans.

### 3.2 Purpose

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

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

- To establish an animal model in pigs for HEV infections using infectious copies from HEV strains
- to evaluate vaccines for humans and pigs (to be used in the current research project and in CRO projects)
- to evaluate antivirals and therapeutics against HEV infection (to be used in CRO projects)

These direct objectives will contribute to the development of strategies for the prevention and treatment of HEV3 infections in humans and to reduce the zoonotic risk by transmission from pigs to humans.

#### 3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

The approach to achieve the goal by using infectious clones to introduce a HEV infection in pigs has already been shown earlier with HEV 4 [10]. Therefore it is highly likely that the infection model for HEV 3 will work, especially as the international project collaborators have a strong experience of producing infectious cDNA clones from positive stranded RNA viruses and have already a HEV 3 clone derived from a severe, human case prepared. The virulence of this human isolate derived clone needs to be proven in the pig model. The international partner, but also our institute have long standing expertise with infections in pigs and also with all facets of research and diagnostics of HEV 3 infections in pigs.

Project partners are developing subunit vaccines against HEV 3 based on a vector-vaccine concept and immunogenicity and efficacy studies will be performed with such vaccines. The current rapid developments of nucleic acid based vaccines like mRNA vaccines make it very likely that research groups will address us in the case a successful model can be provided.

#### 3.2.3 andere wetgeving

X nee



### 3.3 Relevance

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

---

#### 3.3.1

Even though some in vivo or in vitro models have been established for HEV there is a need for an animal experimental model that can reliably reproduce human disease using controlled exposure. There is no treatment available to control acute HEV, although monotherapy with ribavirin seems to elicit an efficient response in chronic HEV patients infected during organ transplantation. There are currently (outside China) no vaccines approved to control HEV, albeit some have been tested in clinical trials but their safety and efficacy needs further studies. Therefore, there is an unmet need for the identification of efficient vaccine candidates to HEV.

The research will contribute to the one-health approach to control HEV in pigs in order to minimize the proportion of pigs carrying HEV at the time of slaughter as requested in a recent EFSA biohazard report [[16].

#### 3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is

Stakeholders in this project are:

- patients suffering from acute or chronic infection with HEV3 and who need early therapeutic means like antivirals to reduce virus load
- immune compromised persons, who could benefit from preventive vaccines, which can only be developed when a reliable animal model is available
- the pig producing sector which needs for a responsible one-health approach means to prevent transmission to humans by for example vaccination.
- the pig as target species might benefit from vaccination as the role of subclinical HEV infections for other diseases is still unclear.
- the research organisation, which makes use of the animal model within current research projects, but also by making the animal model available for collaborations with and services for other academic and private partners

### 3.4 Research Strategy

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

---

Swine are attractive animal models for human infectious diseases due to e.g. similarities in anatomy, physiology and size, availability of samples, and the similarity of the pig immune system to the human counterpart. With the continuous development of porcine immunological reagents to characterize both antigen presenting cells and lymphocytes, including tracking of virus specific T cell responses, meaningful mechanistic models for interpretation of experimental data are available to provide surrogate immunological endpoints that predict human in vivo outcomes.

Genotype 3 of HEV (HEV 3) is a pig virus, and it is expected, that the human infection can readily be compared in this model. Current virus isolates are of low virulence in pigs and therefore a model will be established by evaluating the virulence of infectious clones isolate from a severe disease human patient. The international project group has extensive experience in generating in vivo infectious cDNA clones of difficult-to-culture positive strand RNA viruses, and in adapting them to high titer growth in modified cultures. These models will be used for evaluations of promising new vaccines and therapeutics.

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

---

The lack of reproducible and reliable production of infectious virus in cell-culture systems has hampered the development of animal models for HEV 3. A recent study has shown that infectious clones of HEV 4 can infect pigs and result in virus proliferation and serological response [10] and a similar strategy will be followed in this project for HEV 3.

International collaborators, contributing to this project, have developed techniques to establish infectious clones of HEV viruses of various field isolates from severe HEV 3 infections in humans. These infectious clones will be used to establish the animal model by proof of concept and dose refinement studies. Exploring various administration routes and describing the clinical course of the infection, virus excretion and immunological responses are part of the animal model for further research. Young pigs will be inoculated with the respective infectious clone either intravenously or by intrahepatic injection (under anaesthesia and with ultrasound guidance). The pigs will be followed for a period of three weeks and clinical signs, virus excretion and immunological and clinical-pathological measurements performed and thereafter extensive pathological examination.

If the model development results in a suitable animal model, in which typical signs of hepatitis are expressed and reproduction and excretion of infectious virus can be measured, the established animal model will be used to study the immunogenicity and protection of two different subunit vaccines for use in humans and will also be made available to be used by other vaccine developers for the development of human and pig HEV 3 vaccines. Vaccination studies will be performed in young pigs with vaccine constructs, which have shown immunogenicity either in pigs or other species. These studies will comprise two or three vaccinations in an interval of 2 to 4 weeks followed by a challenge infection and an post-challenge observation period of up to 6 weeks. Serological analysis of blood samples taken before and after vaccination and analysis of T-cell responses will be performed to assess the pre-challenge immune reaction and in the post-challenge period, and viremia and virus excretion after challenge infection as well as clinical-pathological and pathological examinations will be performed. To study vaccine efficacy under natural transmission conditions, protection after vaccination will also be tested in contact studies, where pigs will be infected with an infectious clone and co-housed with naive pigs. Here, especially virus propagation in gastrointestinal tissue and liver and virus excretion will be studied and the efficacy of vaccines to protect against infection via the natural oro-faecal route will be examined.

The evaluation of new therapeutic approaches like antivirals are not part of our own research project, but the developed animal model will be made available to other research groups for pre-clinical testing of new candidates. For the evaluation of antivirals or therapeutics in vivo studies results of preceding in-vitro investigations will be requested and only successful in-vitro candidates will be tested in the pig model. Young pigs will be infected with the infectious clone and the antiviral efficacy will be tested by studying the reduction of signs of hepatitis like the reduced increase of liver enzymes and/or gene expression profiles in blood or liver tissue and the reduction in viremia, virus excretion and virus load in liver tissue and intestinal tract.

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

---

The development of the animal model with infectious clones of HEV 3 resulting in viremia, virus excretion and signs of hepatitis in clinical -chemistry as well as liver pathology and manifestation of hepatitis will be the objective of the first step and is covered by animal procedure 3.4.4.1.

(milestone 1). Following studies (animal procedure 3.4.4.2.) to examine vaccine efficacy in experimentally and naturally (through transmission) infected animals or therapeutic approaches are dependent on the well characterized and reproducible animal model. Currently in our research project two vaccine studies are planned. The model will be offered as contract research activity to academic and private partners for vaccine development and also to study efficacy of antiviral treatments. Here we expect to perform two vaccine studies and two treatment studies in the project period. Therapy candidates and antivirals will only (go/no go) be tested a) if they have been shown to induce in-vitro viricidal activity (selection point) against HEV.

## References

1. Emerson, S.U. and R.H. Purcell, *Hepatitis E virus*. Rev Med Virol, 2003. **13**(3): p. 145-54.

2. Legrand-Abravanel, F., et al., *Hepatitis E virus genotype 3 diversity, France*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(1): p. 110-4.
3. Van der Poel, W.H.M., et al., *Knowledge gaps and research priorities in the prevention and control of hepatitis E virus infection*. Transbound Emerg Dis, 2018. **65 Suppl 1**: p. 22-29.
4. Kenney, S.P. and X.J. Meng, *Hepatitis E Virus: Animal Models and Zoonosis*. Annu Rev Anim Biosci, 2019. **7**: p. 427-448.
5. Meester, M., et al., *Infection dynamics and persistence of hepatitis E virus on pig farms - a review*. Porcine Health Manag, 2021. **7**(1): p. 16.
6. Feagins, A.R., et al., *Cross-species infection of specific-pathogen-free pigs by a genotype 4 strain of human hepatitis E virus*. J Med Virol, 2008. **80**(8): p. 1379-86.
7. Hazards, E.P.o.B., et al., *Public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen*. EFSA J, 2017. **15**(7): p. e04886.
8. Bouwknegt, M., et al., *The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation*. BMC Vet Res, 2009. **5**: p. 7.
9. Scholz, J., et al., *Reverse genetics approaches for hepatitis E virus and related viruses*. Curr Opin Virol, 2020. **44**: p. 121-128.
10. Cordoba, L., et al., *Rescue of a genotype 4 human hepatitis E virus from cloned cDNA and characterization of intergenotypic chimeric viruses in cultured human liver cells and in pigs*. J Gen Virol, 2012. **93**(Pt 10): p. 2183-2194.
11. Zhang, J., et al., *Long-term efficacy of a hepatitis E vaccine*. N Engl J Med, 2015. **372**(10): p. 914-22.
12. *Hepatitis E vaccine: WHO position paper, May 2015*. Wkly Epidemiol Rec, 2015. **90**(18): p. 185-200.
13. Wang, B. and X.J. Meng, *Hepatitis E virus: host tropism and zoonotic infection*. Curr Opin Microbiol, 2021. **59**: p. 8-15.
14. Opriessnig, T., et al., *Future perspectives on swine viral vaccines: where are we headed?* Porcine Health Manag, 2021. **7**(1): p. 1.
15. Kinast, V., et al., *Hepatitis E Virus Drug Development*. Viruses, 2019. **11**(6).
16. EFSA, *Public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen*. EFSA Journal, 2017. **15**(7): p. 4886.

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

| Serial number | Type of animal procedure              |
|---------------|---------------------------------------|
| 1             | Development of a HEV E disease model  |
| 2             | HEV vaccination and treatment studies |

Appendix  
Description animal procedures

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

## 1 General information

| 1.1           | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.                                  | 5.1 lid2h   |               |                          |   |                                      |  |
|---------------|---|---|---------------|--------------------------|---|--------------------------------------|--|
| 1.2           | Provide the name of the licenced establishment.   | 5.1 lid2h   |               |                          |   |                                      |  |
| 1.3           | List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | <table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="435 1021 935 1055">Serial number</th> <th data-bbox="935 1021 1434 1055">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="435 1055 935 1288">1</td> <td data-bbox="935 1055 1434 1288">Development of a HEV E disease model</td> </tr> </tbody> </table> | Serial number | Type of animal procedure | 1 | Development of a HEV E disease model |  |
| Serial number | Type of animal procedure  |   |               |                          |   |                                      |  |
| 1             | Development of a HEV E disease model  |   |               |                          |   |                                      |  |

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

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

---

This procedure will be used to establish the animal model for HEV3 infections in pigs by performing a proof of concept study, a dose refinement study and further studies to characterize the model in more detail by pathogenesis and immunological studies in the course of the HEV3 infection. To establish the infection model 4 to 10 week old pigs will be inoculated with infectious cDNA copies of the virus by various inoculation routes, i.e. either intravenous or into the liver tissue (intrahepatic) under visual control. At least for the latter procedure, pigs are anaesthetized by injection and inocula will be administered under ultra sound control. After inoculation pigs will be followed up to 6 weeks. After inoculation pigs will be examined clinically by visual examination and rectal temperature control daily (or twice daily) and viremia, white blood cell analysis (automated counting, FACS), clinical chemistry with specific focus on liver enzymes and also immune and inflammation related serum parameters will be examined. At the end of the observation period all pigs will be euthanized and undergo pathological examination and tissue will be collected for (immune)histological and virological examination. Primary outcomes of the study are viremia, virus excretion and signs of hepatitis, i.e. increased liver enzymes, systemic inflammation and signs of acute or chronic hepatitis (confirmed by histology). The established model will be further characterized in pathogenesis studies and by studying transmission to naive contact pigs to be able to study effects on the natural infection mode.

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

---

Inoculation of infectious materials and control materials:

- Intravenous inoculation: infectious materials will be administered once in max. 4 ml volume via ear vein catheter or via needle injection into the jugular vein; for the inoculation pigs can be anaesthetized if this is considered necessary to compare the i.v. administration route with the intrahepatic administration.
- Intrahepatic inoculation: infectious materials will be administered in anaesthetized pigs using an ultrasound-guided technique on four different sites of the liver with a maximal volume of 250 µl per site; anaesthesia will be performed by use of injection anaesthesia;

Sampling:

- Blood samples (heparin/EDTA/serum blood) will be collected before inoculation and after inoculation with a maximal volume of 10% of the circulating volume in a period of 4 weeks; after inoculation blood samples will be taken 2 to 4 times per week; for blood sampling pigs will be restrained.
- Faecal samples will be obtained during rectal temperature measurements about two times per week;

Clinical observation:

- After inoculation pigs will be examined twice daily by visual observation and findings recorded, observations will be increased as soon as severe clinical signs occur; note: HEV usually does not induce clinical symptoms, but the choice to use infectious copies of a human isolate from severely ill patient is expected to result in clinical disease signs, like reduced activity, reduced appetite, fever, abdominal pain due to liver swelling, but the degree of severity is not predictable.
- Rectal temperature will be taken once, and around inoculation twice daily without restraining
- Body weight will be determined weekly.

Necropsies: pigs will be euthanized and tissues obtained for virological and pathological examinations.

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

---

---

No statistical methods have been applied for the studies to establish the model, because we do not have experience with this model yet; there is only one study using three pigs per group to show infectivity of the infectious copy. Here we will start with a proof of concept study with groups of six pigs to establish the model and as soon as there is sufficient evidence and information of the standard deviation in regard to the key parameters, the number of animals will be calculated based on these data. However, the model to be used should be statistically meaningful for example in pathogenesis or vaccination studies with maximally 10 animals per group. This is considered a critical point in the acceptance of the model.

---

## **B. The animals**

---

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

Species: pigs; the pig is susceptible to infections with HEV (although without expressing clinical signs, but mild pathological changes in the liver) and due to similarities to the human immune system accepted as animal model;

Origin: SPF pig farm; pigs should be free of relevant porcine pathogens and serological negative for HEV

Life stage: 4 to 10 weeks of age; in field conditions pigs of this age are considered to be susceptible

Numbers: 128 pigs; for the first two studies (proof of concept study, dose refinement study) four groups with 6 pigs per group are used and for later studies (pathogenesis/ model characterization) the numbers per group might be increased to 10 pigs per group, we expect to perform two studies with four groups per study. The exact number of animals will be calculated based on the data of the first studies and justified in the respective experimental plan and discussed with the IvD.

---

## **C. Re-use**

---

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

---

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

No

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

---

## **D. Replacement, reduction, refinement**

---

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

Replacement: The use of in-vitro or other animal-free experimental methods to achieve a model to study the complexity of HEV infections, which enables to study pathogenesis and vaccine efficacy was evaluated, but considered to be not feasible and also not sufficient informative.

Reduction: A literature research on animal models for studies on HEV infection was performed in PubMed and Scopus and revealed that an approach as used here, has been used for HEV 4;

In the exploratory phase, the number of animals to be used is reduced to the minimum, which provides sufficient information in regard to virus proliferation and host response to the infection. The

results of this exploratory phase will determine the numbers of animals for the consecutive studies to be able to achieve meaningful results. The decision of the number of animals and the reasons for this decisions will be discussed in the respective experimental plan and with the IvD.

Refinement: A few animal models for HEV are described in various species, e.g. in non-human primates, rabbits, mouse, rats, and pigs. We chose to develop the animal model in the pig species, because the species is susceptible for (asymptomatic) infection, thus a natural host, and can be used for biomedical research as well as for target animal research (veterinary vaccines). The analytical tool box for pigs like tools for immunological investigations or gene expression studies in infected tissues are well developed in this species.

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

---

No adverse effects on the environment are expected and all studies with infectious cDNA clones will be performed in DM-III conditions as stated in the GMO permission GGO IG 20-076.

## **Repetition and Duplication**

### **E. Repetition**

---

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

---

n/a

## **Accommodation and care**

### **F. Accommodation and care**

---

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

---

No

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

---

Pigs will be kept in pens HEPA filtered pens with straw covered solid floors, pen environment is enriched with changing playing materials

### **G. Location where the animals procedures are performed**

---

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

---

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

---

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

---

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

No > Continue with question I.

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

---

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

---

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

---

Pigs will be kept under anaesthesia during the intra-hepatic inoculation procedure to ensure correct administration of the inoculum. The inoculation is considered to induce similar or less pain as a liver biopsy does; in humans taking of liver biopsies is considered to induce mild pain and there usually no pain relieve methods are applied; in analogy, it is planned not to apply additional pain relieving methods after injection unless inoculation related distress is displayed.

### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

---

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

---

- handling of the animals
- the invasive technique due to the intrahepatic administration
- Single intravenous administration
- effects due to symptomatic infection.
- Repeated blood sampling

Explain why these effects may emerge.

---

Handling of the animals will result in stress. The intrahepatic injection will be done under anaesthesia and ultrasound control, the invasive technique and the intrahepatic administration with low volumes are expected not to induce pain in the period after anaesthesia. Single intravenous administration of inoculum is not expected to cause more pain as the injection pain itself, combined with the stress of restrain. If hepatitis due to the infection occurs, the expected clinical signs are reduced activity, reduced appetite and weight loss, currently more clinical symptoms are not expected. Repeated blood sampling will induce some stress as repeated restrain during blood sampling will cause stress.

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

---

Injection anaesthesia will be used for the intrahepatic injection, all other procedures will be performed in the conscious animal by experienced personnel. To minimize stress the animals will be adapted to handling in the acclimatization period.

### J. Humane endpoints

---



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

No > Continue with question K.

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

The intention of the procedure is to induce an infection, which leads to hepatitis. Acute severe hepatitis can result in pain due to liver swelling and liver inflammation. Pigs are known to be susceptible to HEV infections, but usually manifest only mild signs of hepatitis without any clinical disease signs; we expect that the induced hepatitis will result in signs of hepatitis confirmed by clinical chemistry and pathology, but do not expect severe clinical disease. As, currently we can only speculate on the severity of disease, the following humane endpoints are defined:

- Recumbent at two successive observation moments within 12 hours
- No feed intake for 24 hours
- Weight loss compared to inoculation time point of more than 15% (corrected for age dependent growth curve)

HEP's will be adapted and discussed with IvD, based on the growing experiences in the project.

Indicate the likely incidence.

25% (estimation without evidence)

#### **K. Classification of severity of procedures**

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

Intravenous Inoculation: mild  
Intraheaptic inocuation: moderate  
Due to disease: moderate  
Repeated blood sampling; moderate

Overall: moderate

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Animal will be euthanized and during gross pathology examination appropriate tissues will be collected for further analysis, i. e. at least virology and pathology examinations.

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

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

Yes

---

Appendix  
Description animal procedures

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

## 1 General information

|     |   |                    |   |
|-----|---|--------------------|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.                                  | 5.1 lid2h          |   |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment.   | 5.1 lid2h          |   |
| 1.3 | List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | Serial number<br>2 | Type of animal procedure<br>HEV vaccination and treatment studies |

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

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

---

In this procedure the established animal model for HEV3 infections in pigs is used to evaluate vaccine candidates for human vaccines and for new pig vaccines in target animal studies and to evaluate antivirals and drugs in biomedical studies.

Four to ten week old pigs will be vaccinated once or repeatedly (max. 3 times) in two to four week intervals depending on the vaccine type and at two to six weeks after the last vaccination the pigs will be inoculated with infectious cDNA copies of the virus by the inoculation routes, which was selected from the animal model studies, i.e. either intravenous or into the liver tissue. After vaccination pigs are examined for the occurrence of side effects and the development of immune responses (serological, T-cell responses);

For biomedical studies, i.e. studies to investigate the efficacy of anti-virals/therapeutics in the acute infection phase four to ten week old pigs will be treated with the investigational product, which is either administered once or repeatedly parenteral or by oral administration; only products will be tested which have been shown to be safe in safety studies [note: biomedical studies are not part of the research project, but expected to be requested on the basis of CRO activities or other academic cooperations].

After challenge inoculation with the infectious cDNA clone pigs will be followed up to 6 weeks. In vaccine studies additional non-vaccinated control groups may be used, by which the protection against natural transmission will be studied.

After inoculation pigs will be examined clinically by visual examination and rectal temperature control daily (or twice daily) and viremia, white blood cell analysis (automated counting, FACS), clinical chemistry with specific focus on liver enzymes and also immune and inflammation related serum parameters will be examined

At the end of the observation period all pigs will be euthanized and undergo pathological examination and tissue will be collected for (immune)histological and virological examination. Primary outcomes of the study are reduction in viremia and virus excretion and reduction in signs of hepatitis, i.e. change in liver enzyme content in blood, systemic inflammation and signs of acute or chronic hepatitis (confirmed by histology).

---

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

---

Treatment:

- Vaccination will be done one to three times and depending on the vaccine candidate this can be done by various routes, i.e. intramuscular (max. 2 ml/site), subcutaneous (max. 2 ml/site); intradermal (100 µl/site) or by mucosal vaccination (intranasal/oral).
- antivirals or drugs for treatment, which will be evaluated will be administered orally (once or by daily gavage) or by injection ones or maximum of three times;

Inoculation of infectious materials and control materials:

- Intravenous inoculation: infectious materials will be administered in max. 4 ml volume via ear vein catheter or via needle injection into the jugular vein; for the inoculation pigs can be anaesthetized if this is considered necessary to compare the i.v. administration route with the intrahepatic administration.

- Intrahepatic inoculation: infectious materials will be administered in anaesthetized pigs using an ultrasound-guided technique on four different sites of the liver with a maximal volume of 250 µl per site; anaesthesia will be performed by use of injection anaesthesia;

Sampling:

- Blood samples (heparin/EDTA/serum blood) will be collected from the jugular vein before inoculation and after inoculation with a maximal volume of 10% of the circulating volume in a period

of 4 weeks; after inoculation blood samples will be taken 2 to 4 times per week; for blood sampling pigs will be restrained.

- Faecal samples will be obtained during rectal temperature measurements about two times per week;

Clinical observation:

- After inoculation pigs will be examined twice daily by visual observation and findings recorded, observations will be increased as soon as severe clinical signs occur; note: HEV usually does not induce clinical symptoms, but the choice to use infectious copies of a human isolate from severely ill patient is expected to result in clinical disease signs, like reduced activity, reduced appetite, fever, abdominal pain due to liver swelling, but the degree of severity is not predictable.

- Rectal temperature will be taken once, and around inoculation twice daily without restraining

- Body weight will be determined weekly.

Necropsies: pigs will be euthanized and tissues obtained for virological and pathological examinations.

---

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

---

No statistical methods have been applied for these studies and the numbers of animals per group depend on the established model, because we do not have experience with this model yet; based on the information from the model development studies on means and standard deviation of key parameters such as virus excretion, virus load, change in biochemical data or pathology data, the number of animals will be calculated based on these data. Key parameters can differ between the objectives of the vaccination or treatment studies and the effect size, (incl. power and probability) will be defined before. Based on the figures of the model development studies, it will be decided whether the objective is achievable. However, the model to be used should be statistical meaningful in vaccination and biomedical studies with maximally 10 animals per group. This is considered a critical point in the acceptance of the model. The exact numbers will be calculated based on the data of the established animal model and justified in the respective experimental plan and discussed with the IVD.

## **B. The animals**

---

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

---

Species: pigs; the pig is susceptible to infections with HEV (although without expressing clinical signs, but mild pathological changes in the liver) and due to similarities to the human immune system accepted as animal model;

Origin: SPF pig farm; pigs should be free of relevant porcine pathogens and serological negative for HEV

Estimated number: 240; It is expected that the availability of the animal model will stimulate requests from vaccine developers to investigate the immunogenicity and efficacy of new developed vaccine candidates; therefore we assume to perform 4 studies with about six treatment groups and a maximum number of 10 pigs per group

Life stage: 4 to 10 weeks of age; in field conditions pigs of this age are considered to be susceptible

## **C. Re-use**

---

Will the animals be re-used?

---

No, continue with question D.

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

---

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

---

No

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

---

#### **D. Replacement, reduction, refinement**

---

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

---

Replacement: The use of in-vitro or other animal-free experimental methods to achieve information on the immunogenicity of vaccines and the efficacy of vaccines or antivirals/drugs in the complexity of a HEV infections was evaluated, but considered to be not feasible and also not informative.

Reduction: A literature research on animal models for studies on HEV infection and vaccination was performed in PubMed and Scopus and used for the development of the animal model.

The results of this development phase determines the numbers of animals for the consecutive studies to be able to achieve meaningful results. The decision of the number of animals and the reasons for this decisions will be discussed in the respective experimental plan and with the IvD.

Refinement: A few animal models for HEV are described in various species, e.g. in non-human primates, rabbits, mouse, rats, and pigs. We chose to develop and use the animal model in the pig species, because the species is susceptible for (asymptomatic) infection, thus a natural host, and can be used for biomedical research as well as for target animal research (veterinary vaccines). The analytical tool box for pigs like tools for immunological investigations or gene expression studies in infected tissues are well developed in this species.

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

---

No adverse effects on the environment are expected and all studies with infectious cDNA clones will be performed in DM-III conditions as stated in the GMO permission GGO IG 20-076.

### **Repetition and Duplication**

#### **E. Repetition**

---

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

---

n/a

### **Accommodation and care**

#### **F. Accommodation and care**

---

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

---

#### **F. Accommodation and care**

No

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

Pigs will be kept in HEPA filtered pens with straw covered solid floors, pen environment is enriched with changing playing materials

#### **G. Location where the animals procedures are performed**

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

### **Classification of discomfort/humane endpoints**

#### **H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Pigs will be kept under anaesthesia during the intra-hepatic inoculation procedure to ensure correct administration of the inoculum. The inoculation is considered to induce similar or less pain as a liver biopsy does; in humans taking of liver biopsies is considered to induce mild pain and there usually no pain relieve methods are applied; in analogy, it is planned not to apply additional pain relieving methods after injection unless inoculation related distress is displayed.

#### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

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

- handling of the animals
- the invasive technique due to the intrahepatic administration
- Single intravenous administration
- effects due to symptomatic infection.
- Repeated blood sampling

Explain why these effects may emerge.

---

Handling of the animals will result in stress.

Vaccination can result in local site reactions, which can result in short lasting increase of body temperature or local swellings and in very exceptional situation to allergic shock like reactions. It will also lead to restrain stress during the vaccination procedure.

The intrahepatic injection for the injection of challenge materials will be done under anaesthesia and ultrasound control, this invasive technique and the intrahepatic administration with low volumes are expected not to induce pain in the period after anaesthesia.

Single intravenous administration of inoculum is not expected to cause more pain as the injection pain itself, combined with the stress of restrain.

If hepatitis due to the infection occurs, the expected clinical signs are reduced activity, reduced appetite and weight loss, currently more clinical symptoms are not expected.

Repeated blood sampling will induce some stress as repeated restrain during blood sampling will cause stress

---

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

To minimize stress the animals will be adapted to handling in the acclimatization period.

During the vaccination phase animals will be observed directly after vaccination (30 minutes) and if adverse, shock like reactions occur appropriately treated, additionally body temperatures and local site reactions will be observed and recorded and treated if necessary.

Injection anaesthesia will be used for the intrahepatic injection, if used, all other procedures will be performed in the conscious animal by experienced personnel.

---

## **J. Humane endpoints**

---

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

No > Continue with question K.

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

---

The intention of the procedure is to induce an infection, which leads to hepatitis. Acute severe hepatitis can result in pain due to liver swelling and liver inflammation. Pigs are known to be susceptible to HEV infections, but usually manifest only mild signs of hepatitis without any clinical disease signs; we expect that the induced hepatitis will result in signs of hepatitis confirmed by clinical chemistry and pathology, but do not expect severe clinical disease. As, currently we can only speculate on the severity of disease, the following humane endpoints are defined:

- Recumbent at two successive observation moments within 12 hours
- No feed intake for 24 hours
- Weight loss compared to inoculation time point of more than 15% (corrected for age dependent growth curve)

HEP's will be adapted and discussed with IvD, based on the growing experiences in the project.

---

Indicate the likely incidence.

10% (estimation without evidence as currently no figures are available; we also take in account that vaccination/treatment is to a certain degree effective)

---

## **K. Classification of severity of procedures**

---

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



---

Repeated Vaccination i.m. or intradermal: mild  
Intravenous Inoculation: mild  
Intraheaptic inocuation: moderate  
Due to disease: moderate  
Repeated blood sampling; moderate

Overall: moderate

## End of experiment

### L. Method of killing

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

---

Animal will be euthanized and during gross pathology examination appropriate tissues will be collected for further analysis, i. e. at least virology and pathology examinations.

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

---

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

---

Yes

---

|  |   |
|--|---|
| Naam van het project   | Ontwikkeling van een hepatitis E genotype 3 diermodel voor vaccinatie en interventiestudies in varkens  |
| NTS-identificatiecode  | NTS-NL-367644 v.1   |
| Nationale identificatiecode van de NTS<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i> |   |
| Land   | Nederland   |
| Taal   | nl  |
| Indiening bij EU<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>                       | ja  |
| Duur van het project, uitgedrukt in maanden.                                   | 60  |
| Trefwoorden  | Hepatitis<br>vaccins<br>antivirale middelen<br>HEV<br>varken  |
| Doel(en) van het project   | Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Besmettelijke ziekten van de mens<br>Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Ziekten en aandoeningen van dieren |

#### DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

|   |  |
|---|--|
| Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).  | Hepatitis E virus veroorzaakt acute en chronische leverontsteking (Hepatitis E) met jaarlijks meerdere miljoenen infecties en ca. 300.000 doden wereldwijd. De meeste infecties komen voor in Azië, maar ook in Europa worden regelmatig gevallen gezien vooral bij patiënten met een verzwakt immuun systeem. Het virus komt voor in vier verschillende genotypen, waarbij de genotype 1 en 2 de meest belangrijke oorzaak van hepatitis E zijn en voornamelijk in Aziatische landen voorkomen. Het in Europa voorkomende genotype 3 (HEV 3) wordt ook als een veroorzaker van hepatitis in de mens gezien. HEV 3 komt veelvuldig in varkens voor en zowel de dieren als ook producten van varkens kunnen een risico voor overdracht naar de mens vormen. Omdat het varken ook een natuurlijk gastheer van HEV is, kan het een geschikt diermodel zijn. Een dergelijk diermodel is belangrijk voor vaccinonderzoek naar vaccins voor de mens als ook voor onderzoek naar behandeling bij het optreden van ziekte. Er bestaan nu in Europa geen vaccins tegen deze aandoening en het meest gebruikte medicijn ter behandelingen van zieke patiënten blijkt niet altijd werkzaam te zijn. Het virus is nauwelijks te kweken en daarom zijn dieren tot nu toe experimenteel alleen door gebruik van weefsel en faeces te infecteren. Daarmee zijn dierstudies moeilijk te standaardiseren. Zogenoemde infectieuze kopieën, die van genetisch materiaal van HEV gemaakt zijn, zijn succesvol voor de infectie met een andere HEV genotype (genotype 4) gebruikt en het is zeer waarschijnlijk dat een diermodel voor HEV 3 kan worden ontwikkeld en voor onderzoek naar vaccins tegen HEV 3 en naar behandeling van infecties met HEV genotype 3 te gebruiken. Doel van dit project is een reproduceerbaar diermodel van HEV 3 infecties in varkens te ontwikkelen en met dit model nieuwe vaccins voor mens of varken te testen en de werkzaamheid van antivirale middelen of andere medicatie ter behandeling van de ziekte te onderzoeken. |
| Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid | Dit onderzoek is gericht op de ontwikkeling van een geschikt diermodel om vervolgens nieuwe vaccins en nieuwe antivirale middelen voor de behandeling van hepatitis E patiënten te testen. Vaccins kunnen vooral voor mensen met een verzwakt immuunsysteem van belang zijn. Vaccinatie van varkens kan een geschikt middel zijn om HEV 3 vrije varkens te produceren en daarmee het risico van overdracht van dier op mens te verminderen.  |

tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

## VOORSPELDE SCHADE

| <p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>  | <p>Bij de ontwikkeling van het diermodel wordt het infectieuze materiaal eenmalig door intraveneuze toediening of door directe injectie in de lever toegediend. Voor de toediening in de lever worden de dieren onder narcose gebracht en de injectie van kleine hoeveelheden in de lever onder zicht controle uitgevoerd. De resultaten van de modelontwikkelings-studies bepalen of de experimentele infectie tijdens de vaccinatie of behandeling studies intraveneus of in de lever worden uitgevoerd. Voor en na infectie worden bloedmonsters genomen om hoeveelheid virus in het bloed en veranderingen ten gevolge van een leverontsteking te kunnen meten (frequentie ca. 10x). Bij het testen van nieuwe vaccins zullen deze een of tot drie keer toe in de spier of in de huid worden toegediend. De behandeling met antivirale middelen zal of oraal via mond of slokdarm of door injectie in de spier worden uitgevoerd. Tijdens vaccinatie- of behandelstudies worden monsters voor en na behandeling genomen (max. 10 x).</p> |                |  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |   |     |   |   |     |   |
|--|--|----------------|--|------------------------------------|---------|-------------|----------------|-------------|-------|-------|---------|---|-----|---|---|-----|---|
| <p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p> | <p>Natuurlijke infecties met HEV 3 infecties in het varken door orale opname verlopen zonder klinische verschijnselen en alleen in het leverweefsel zijn daarbij lichte ontstekingen te vinden. In het hier boogde model is de infectieroute door de intraveneuze toediening of toediening direct in de lever anders dan onder normale omstandigheden en is het infectieuze materiaal afkomstig van ernstig zieke patiënten. Dit kan ertoe leiden, dat er een ernstiger vorm van leverontsteking op gaat treden en dat ook klinische verschijnselen kunnen ontstaan met gewichtsverlies, verminderde activiteit en pijn door zwelling van de lever. De handelingen aan de dieren als ook de toedieningen of het verzamelen van bloedmonsters zullen tevens kortdurend ongerief veroorzaken.</p>  |                |  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |   |     |   |   |     |   |
| <p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>                                 | <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Varkens (<i>Sus scrofa domestica</i>)</td> <td>368</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>368</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>  | Soort:         | Totaal aantal  | Geraamde aantallen naar ernstgraad |         |             |                | Terminaal   | Licht | Matig | Ernstig | Varkens ( <i>Sus scrofa domestica</i> ) | 368 | 0 | 0 | 368 | 0 |
| Soort:   | Totaal aantal  |                |  | Geraamde aantallen naar ernstgraad |         |             |                |             |       |       |         |   |     |   |   |     |   |
|  |  | Terminaal      | Licht  | Matig                              | Ernstig |             |                |             |       |       |         |   |     |   |   |     |   |
| Varkens ( <i>Sus scrofa domestica</i> )  | 368  | 0              | 0  | 368                                | 0       |             |                |             |       |       |         |   |     |   |   |     |   |
| <p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>   | <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>   | Soort:         | Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren |                                    |         | Hergebruikt | Teruggeplaatst | Geadopteerd |       |       |         |   |     |   |   |     |   |
| Soort:   | Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren   |                |  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |   |     |   |   |     |   |
|  | Hergebruikt  | Teruggeplaatst | Geadopteerd  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |   |     |   |   |     |   |
|  |  |                |  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |   |     |   |   |     |   |
| <p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>  | <p>Na afloop van de studiefase worden de dieren gedood om weefsel voor verder onderzoek naar aanwezigheid van virus en naar pathologische veranderingen te onderzoeken.</p>  |                |  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |   |     |   |   |     |   |

## TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

|   |   |
|---|---|
| <p><b>1. Vervanging</b><br/>Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>   | <p>Onderzoeken naar HEV infecties worden in het laboratorium in celculturen en ook in complexere cel systemen uitgevoerd, echter zijn het ziekteproces en de vermindering van virus en de reductie van pathologische veranderingen voor het testen van bescherming na vaccinatie alleen in een dierstudie te onderzoeken.</p>   |
| <p><b>2. Vermindering</b><br/>Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p> | <p>Bij het vaststellen van het aantal dieren is rekening gehouden met studies die eerder uitgevoerd zijn, waarbij of vergelijkbaar infectiemateriaal of geïnfecteerd weefsel is gebruikt. Daarnaast is het aantal dieren, dat voor behandeling- of vaccinatiestudies gebruikt wordt, zo berekend dat er medisch-biologisch relevante verschillen aangetoond worden.</p>   |
| <p><b>3. Verfijning</b><br/>Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>  | <p>Alle handelingen aan de dieren zoals intraveneuze bloedmonsternamen, intraveneuze toediening en intrahepatische toediening worden door ervaren personeel uitgevoerd. In de acclimatisatieperiode wordt erop gelet, dat de dieren gewend raken aan handelingen. In de infectiefase worden de dieren ten minste twee keer per dag beoordeeld en afhankelijk van de ziekte ontwikkeling zal dit vaker gedaan worden. Humane eindpunten zijn vastgelegd om onnodige verlenging van een pijnperiode te voorkomen.</p>   |
| <p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>  | <p>Het onderzoek wordt in jonge varkens uitgevoerd omdat deze diersoort bekend is, gevoelig te zijn voor een infectie met HEV 3. Op een groot deel van de Nederlandse varkensbedrijven zijn varkens geïnfecteerd met het virus en vormen daarom ook een mogelijke bron voor infectie voor de mens. De infectie in varkens verloopt meestal zonder ziekteverschijnselen, echter door de keuze van het infectiemateriaal is de verwachting dat in ons model ook een ontsteking in de lever op gaat treden, net als bij de mens. Door de ontwikkeling van nieuwe vaccins en het testen in varkens is de verwachting dat zowel vaccins voor de mens als ook voor varkens kunnen worden getest. Tevens kunnen op grond van grote overeenkomstigheden in de immunologische afweer en in andere orgaanfuncties tussen mens en varken nieuwe behandelingen tegen HEV infecties bij de mens worden getest.</p> |

**VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT**

|  |     |
|--|-----|
| Project geselecteerd voor BA?                                | nee |
| Termijn voor BA  |     |
| <b>Reden voor de beoordeling achteraf</b>                    |     |
| Bevat ernstige procedures                                    |     |
| Maakt gebruik van niet-menselijke primaten                   |     |
| Andere reden   |     |
| Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf |     |

**AANVULLENDE VELDEN**

|   |  |
|---|--|
| Nationaal veld 1<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>          |  |
| Nationaal veld 2<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>          |  |
| Nationaal veld 3<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>          |  |
| Nationaal veld 4<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>          |  |
| Nationaal veld 5<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>          |  |
| Startdatum project<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>        |  |
| Einddatum project<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>         |  |
| Goedkeuringsdatum project<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i> |  |
| ICD-code 1<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>                |  |
| ICD-code 2<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>                |  |
| ICD-code 3<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>                |  |
| Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem      |  |

---

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** maandag 12 april 2021 09:27  
**Aan:** 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 202114785  
**Bijlagen:** 2020.D\_0037\_PV\_1\_tek\_os.pdf; NTS\_ADV 5.1 lid2h 2020.D\_0037\_os.xlsx; 2020.D\_0037\_PP\_3\_os.pdf; 2020.D\_0037\_DAP\_3\_os.pdf

Geachte leden van 5.1 lid2h

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening advies te geven over het project met als titel: "Development of a Hepatis E genotype 3 animal model and use in vaccine and treatment" en aanvraagnummer: AVD 5.1 lid2h 202114785.

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 12-04-2021, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommekeer per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 12-04-2021 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
.....

T: 0900 2800028  
E: info@zbo-ccd.nl

Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Geachte CCD,  
Onderstaand het advies dat de **5.1 lid2h** geeft aangaande het betreffende project.

#### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD****5.1 lid2h** **202114785**
2. Titel van het project: Development of a Hepatitis E genotype 3 animal model and use in vaccine and treatment studies in pigs
3. Titel van de NTS: Ontwikkeling van een hepatitis E genotype 2 diermodel voor vaccinatie en interventiestudies in varkens
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:  
**5.1 lid2h**
6. Adviestraject  
Ontvangen door DEC: 12-04-2021  
Aanvraag compleet: 12-04-2021  
In vergadering besproken: 19-04-2021 en 09-08-2021  
Anderszins behandeld: n.v.t.  
Termijnonderbreking(en) van 20-04-2021 tot 28-07-2021  
Besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen: n.v.t.  
Aanpassing aanvraag: 28-07-2021  
Advies aan CCD: 19-08-2021
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
8. Eventueel horen van aanvrager  
Datum: 19-04-2021  
Plaats: online  
Aantal aanwezige DEC-leden: 7  
Aanwezige (namens) aanvrager: aanvrager  
Gestelde vragen en antwoorden:
  - wat is de noodzaak van het ontwikkelen van vaccins en antivirale middelen tegen HEV3 (Hepatitis E virus genotype 3)?
  - *HEV3 komt in Europa veel voor op varkensbedrijven en is met name een risico voor immuungecompromitteerde patiënten. Dit wordt onderstreept door o.a. Sanquin, RIVM en de onderzoeksgroep van de aanvrager. Een Deense onderzoeksgroep heeft nu het verzoek gedaan om dit project op te starten en een model te ontwikkelen. Immuungecompromitteerden krijgen het virus naar verwachting van de onderzoeker vooral binnen via contaminatie (vlees, transfusieproducten etc.) of via expositie aan varkensexcrementen. Ondanks alle voorzorgsmaatregelen moet deze groep patiënten extra beschermd worden. De onderzoeker kan geen aantallen geven over de omvang van het probleem, maar kan enkel aangeven dat HEV3-infectie als een probleem gezien wordt.*
  - Op de vraag van de DEC waarom het zo'n belangrijk onderzoek is kon de onderzoeker geen duidelijk antwoord geven, omdat hij tijdens het gesprek aangaf dat hij daar onvoldoende inzate. De onderzoeker gaf aan dat hij als modelleur gevraagd is om te participeren in het consortium en vanuit zijn werkveld niet volledig op de hoogte is van vragen die de humane kant betreffen.



- Waarom kiest men voor een model dat zo ver af staat van de natuurlijke route?  
*Hierdoor is het model beter te standaardiseren en anders zijn de klinische effecten in het varken te klein. Men verwacht dat men met dit model wel klinische verschijnselen in varkens kan opwekken.*
- Zijn er voor de andere HEV types ook modellen ontwikkeld?  
*Voor HEV4 bestaat wel een model maar dat voor type 1 en 2 zijn er waarschijnlijk geen modellen.*
- Zou er dan niet voor type 1 en 2 een model ontwikkeld moeten worden?  
*Dit onderzoek richt zich op Europa waar HEV3 vooral voorkomt en het varken zowel modeldier als doeldier is.*
- Zullen varkenshouders wel bereid zijn om hun dieren te vaccineren tegen iets waar ze geen "last" van hebben?  
*Er zijn wel farmaceuten bezig met het ontwikkelen van HEV3-vaccins maar dat die nog geen model hebben. Het gaat dan met name om vraag vanuit de humane gezondheid; daar is behoefte aan een vaccin. De onderzoeker is door een Deense en een Amerikaanse groep benaderd als modelleur om kennis te delen, een model te maken en de andere onderzoeksgroepen te ondersteunen.*

#### 9. Correspondentie met de aanvrager

Datum vragen: 20-04-2021

Gestelde vragen en antwoorden:

- U gaf aan dat u als modelleur gevraagd bent om te participeren in het consortium en vanuit uw werkveld niet volledig op de hoogte bent van vragen die de humane kant betreffen. Voor de DEC is het echter belangrijk om goed te weten welke vragen er spelen die het onderzoek rechtvaardigen: hoe groot is het probleem, waarom zijn andere maatregelen (zoals beter screenen van bijv. transfusieproducten, hygiënemaatregelen en voedseladviezen) niet voldoende, wat is de kans dat een vaccin daadwerkelijk ingezet gaat worden?  
De DEC heeft deze informatie nodig om een goede schade-baten-analyse uit te voeren. Kunt u de partners in het samenwerkingsverband, die inhoudelijk als de eigenlijke aanvragers kunnen worden beschouwd, vragen om het doel van het project beter te onderbouwen en de rationale van het project uitgebreider te verwoorden?  
*Literature reference 16 of the project description, this is an EFSA report from 2017 (EFSA, Public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen. EFSA Journal, 2017. 15(7): p. 4886) summarizes the recent situation of HEV infections in Europe and states, that "... the reported HEV clinical cases increased from 514 in 2005 to 5617 cases in 2015 with overall more than 21.000 cases reported in 22 EU countries between 2005 and 2017" and that "...more than 95% of the human infections were autochthonous, locally acquired (within the country of residence) due to infection with HEV-3 viruses". About 50% of the cases are hospitalized. Following the questions by the DEC, we informed at RIVM about the current situation in NL and were informed that there were 160 to 300 cases per year from 2016 to 2020 in the Netherlands.*  
*This information will be added to the PP.*  
*There is no doubt that screening of critical products like blood products and also hygiene measures contribute importantly to prevent infections. However, a high seroprevalence of 60 to 100% on farm level and a varying degree of active infections in slaughter pigs, which carry infectious virus, are expected to lower the success of such measures. The use of a HEV vaccine in susceptible humans is considered to be a valid and relevant tool to protect immunocompromised patients, a specific target group mentioned by the international collaborators are organ-transplant patients. However, as important as the development of new vaccines is the development of new treatments. The currently used antiviral ribavirin is in less than 50% effective and an animal model to evaluate new therapy concepts as antivirals or hepatitis specific treatments is essential.*  
  
*Vaccines for use in pigs are considered to be a valuable tool in reducing the prevalence of HEV in the pig population. This is also supported in a recent review article by Meester et al. 2021 (Ref.nr. 5)*
- De DEC vraagt zich af hoe zinvol het is om een vaccin te ontwikkelen voor immuungecompromitteerden. In het algemeen zijn vaccins voor deze patiënten weinig effectief.  
*As mentioned above are organ-transplant patients a major target. We would like to stress, that it is common procedure to administer vaccines against various infectious*

*diseases to immunocompromised patients; to withheld vaccines is considered as medical malpractice. The reduced immuno-competence might have to be addressed in these patients by more frequent vaccine administrations.*

- De DEC wil weten of het haalbaar is dat men met deze infectieuze kloon een klinisch model kan ontwikkelen.  
Wanneer is het model geschikt? Waar moet een model aan voldoen? Hiervoor moeten go/no go's ingebouwd worden.  
*The reverse genetic system technology offers the possibility to establish infectious copies of viruses; this technology has been successfully developed in the recent 30 years for various viruses. The technology offers especially opportunities for such viruses, which are difficult to propagate and culture in cell systems. As mentioned in the project description is the lack of suitable cell culture systems a severe bottleneck in HEV3 research. The experiences with infectious copy technologies and the example of a successful pig study after transfection with HEV4 infectious clone makes the chance to develop a successful animal model with clinical signs of disease very likely. The choice to use genetic material of the isolated genome of a virulent human strain also increases the probability of a successful infection model. As already mentioned in the project description under 3.4.3 is the model only of interest if: signs of hepatitis (increased levels of AST, ALAT and/or  $\gamma$ GT in serum), virus replication in the liver and virus excretion in feces as well as inflammatory changes in liver tissue can be observed. In the project description the clinical chemistry parameters are added and the go/no go decision clarified*
- Er wordt opgemerkt dat terminologie als "proof of concept" en "dose finding" gereserveerd is voor klinische fase studies en dat deze termen in dit geval voor verwarring zouden kunnen zorgen.
- *The term proof of concept is not restricted to clinical phase studies and broadly used in pre-clinical studies, but to prevent any confusion the terms are deleted.*
- Als er geen excretie van het virus is hoeft er dan geen transmissieonderzoek meer uitgevoerd te worden? Welke go/no go's zijn hier voor.  
*As already mentioned in the project description is fecal excretion after hepatic virus proliferation expected and considered as a hall mark of the successful animal model.*
- Het pathogenese-onderzoek wordt veel te summier beschreven. Er moet beter onderbouwd worden waar men naar kijkt, wat er al bekend is, waarom men dit wil onderzoeken. Ook zal dan de infectieroute goed onderbouwd moeten zijn (de DEC vraagt zich af wat pathogeneseonderzoek bij de zo ver van de natuurlijke route afstaande intrahepatische of intraveneuze infectieroute kan opleveren), evenals de leeftijd van de dieren (waarom niet bij jongere dieren of juist bij volwassen dieren, waarom niet bij dieren met maternale immuniteit, etc.). De DEC is van mening dat pathogenese-onderzoek geen deel uit kan maken van bijlage 1 maar onderwerp van een aparte bijlage zou moeten zijn.
- *The mentioned pathogenesis research is omitted from this project license request and will be due to a separate license request after having established a successful model. It was mentioned here, to keep this opportunity to be able submit grant proposals with the already accepted project licenses for such studies, anticipating that the type of animal study, the animal procedures and the animal distress are comparable to those described in the animal model, but type of infectious clones will vary as well as administration routes and extended immunological research will be planned. But, currently, there is no grant available for such research and therefore this part is omitted from the proposal. The intrahepatic administration is chosen because transfection of infectious copies into liver cells needs the close proximity of the material and the permissive cells. This might be achieved by direct inoculation into the liver or by systemic distribution via the bloodstream. Both inoculation routes have also been used for studies with HEV4 infectious copies. The choice of age is based on the known susceptibility of this age group and has also practical reasons.*
- Is het mogelijk om dieren in groepshuisvesting te houden wanneer er sprake is van een orofaecale besmettingsroute?  
*Yes; indeed we hope to achieve faecal excretion of virus after infection, but it is unclear in how far excreted virus is infectious and will result in fecal excretion of infected pigs. An effect on clinical or morphological signs of hepatitis is highly unlikely as common intestinal HEV infections in pigs are without clinical symptoms.*
- De onderzoeker geeft aan dat er geen HEP's verwacht worden. Vervolgens worden er wel HEP's beschreven. Dat is verwarrend. In wat de onderzoeker in de HEP's beschrijft kan de DEC zich niet geheel vinden. Er wordt gesproken van een gewichtsafname van 15%. Bij 1x per week wegen is het niet opportuun om dat als HEP te definiëren. De

DEC is van mening dat als HEP's niet aan de orde zijn ze ook niet beschreven moeten worden.

*It is true, that our experiences with natural infections did not result in any clinical symptoms. But as the intention is to induce hepatitis it is unclear, what kind of symptoms will be developed and how severe these signs will be. To cover acute pain and distress the first two criteria (recumbency, no feed intake) are determined as HEP's; the weight loss measured in a week interval is here purposely named and this information is used as scientific HEP. A daily weight observation will not contribute to a better defined HEP. HEP's can and will be adapted based on the experiences with the studies in DAP 1.3.1 and discussed with the IVD.*

- De DEC is van mening dat U eerst een pilot zou moeten opzetten, ongeveer zoals u in bijlage 1 beschrijft en gevolgd door een go/no go beslissing. Wanneer men dan hier de resultaten van heeft en aangetoond heeft dat een werkzaam HEV3-model met klinische verschijnselen mogelijk is, kan beter de richting worden geduid in een nieuw project. *This was always the intention and was already phrased by the term Milestone 1 in the original description, but is now further clarified.*

Het horen van de onderzoeker en de antwoorden op de schriftelijke vragen hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

#### 10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

- N.v.t.

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

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

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

1. De DEC heeft vastgesteld dat, na aanpassing van de aanvraag en beantwoording en verwerking van de antwoorden op de vragen van de DEC, de aanvraag aanzienlijk verbeterd en toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Bijlage 1 is gericht op het ontwikkelen van een reproduceerbaar diermodel waarin effecten van vaccins en antivirale middelen kunnen worden getest. Deze middelen worden onder bijlage 2 getest.
2. De DEC heeft geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort, gesignaleerd die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan.
3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.

#### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van de aanvraag is het ontwikkelen van een reproduceerbaar ziektemodel in varkens voor HEV3-infectie.  
Het uiteindelijke doel van de aanvraag is het testen van vaccins en antivirale middelen tegen HEV3-infecties voor mensen en varkens.  
De DEC heeft vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen en dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belanghebbenden en hun morele waarden in het project zijn:
  - Mensen, met een HEV3-infectie, hebben een gezondheidsbelang bij het voorkomen, resp. behandelen van een HEV3-infectie.
  - De varkenshouderij dient een volksgezondheidsbelang en heeft mogelijk een belang van economische waarde als zij vlees kan leveren dat een zo laag mogelijk risico van besmetting op mensen (zoönose) geeft.
  - De farmaceutische industrie (zowel humaan als veterinair) heeft een economisch belang bij het verkopen van vaccins en therapeutische middelen tegen HEV3.
  - De onderzoekers/CRO hebben een kennisbelang bij het vergaren van kennis en een economisch belang omdat dit onderzoek in opdracht wordt uitgevoerd.
  - De proefdieren ervaren stress en ongerief door de proefbehandelingen.

- De varkens in de houderij (doeldieren) worden niet ziek van een HEV3-infectie en zullen zeer weinig/geen ongerief ervaren van het toedienen van de vaccinatie en hebben er ook geen baat bij.
6. Voor zover de DEC dat kan inschatten is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. De onderzoekers hebben technische kennis en ervaring op dit gebied en werken samen met internationale onderzoekers die veel ervaring hebben in dit werkveld.
8. Ervaringen met HEV4 maken het slagen van de ontwikkeling van dit diermodel mogelijk. Het HEV4 model is echter nog niet in immuungecompromitteerde mensen getest. Het is dus onzeker of het HEV3 model voor deze doelgroep geschikt zal zijn.

#### *Welzijn dieren*

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn); de dieren zijn uit de commerciële houderij afkomstig.
- De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geëvalueerd.
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU voor zover ze niet met HEV3 zijn besmet. Na besmetting moeten de dieren in een High Containment Unit gehuisvest worden waar, om technische redenen, niet volledig aan de eisen voor bedding kan worden voldaan.
11. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "matig" realistisch is ingeschat en geëvalueerd. De ingrepen zijn technieken voor proefdieren die naar verwachting niet meer dan matig ongerief geven. Er zijn echter aanpassingen in de infectieuze besmetting (virulente virussen verkregen van ernstig zieke mensen) die mogelijk meer ongerief kunnen geven in het diermodel. Dit zou nodig zijn om een klinisch model op te zetten waarbij ook kliniek wordt gezien bij de proefdieren. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit: intrahepatische toediening onder narcose, bloedafname, intradermale, intramusculaire of orale toediening, euthanasie.
12. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier anders dan als gevolg van de proefbehandelingen. De integriteit van de dieren wordt aangetast door de biotechnische handelingen.
13. HEP's worden niet verwacht omdat een HEV3 infectie bij varkens doorgaans geen verschijnselen geeft. Echter, HEP's worden ook niet uitgesloten, omdat men met meer infectieus materiaal gaat werken en zijn om die reden toch geformuleerd en zullen steeds met de IvD worden besproken. De HEP's zijn in de ogen van de DEC voldoende omschreven.

#### *3 V's*

14. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Reactie van het dier, evenals het effect van vaccins of therapeutische middelen kan alleen in het levende dier worden beoordeeld.
15. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Er is nog geen ervaring waarop statistisch de benodigde groepsgrootte kan worden berekend. De startaantallen zijn in de ogen van de DEC aanvaardbaar. Zodra data beschikbaar worden kunnen de aantallen worden aangepast. De IvD kan hier op toezien. De vraag voor bijlage 2 is ingeschat.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De varkens worden, waar mogelijk, gehuisvest in groepen in hokken met stro en speelgoed. Bij intrahepatische inoculatie wordt anesthesie toegepast. De DEC ziet geen extra mogelijkheden voor verfijning, anders dan die de onderzoeker nu toepast.
17. Er is geen sprake van wettelijk verplicht onderzoek; de vraag over duplicatie is niet van toepassing.

*Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

18. Er wordt niet aangegeven dat de dieren niet van beide geslachten in gelijke mate worden ingezet in de proeven.
19. De dieren worden wel gedood in het kader van het project omdat de dieren pathologisch en virologisch onderzocht moeten worden. De dieren worden gedood volgens een passende methode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Herplaatsing of hergebruik is niet van toepassing.

*NTS*

21. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7.

**D. Ethische afweging**

1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt het ontwikkelen, en daarna toepassen, van een ziektemodel in varkens voor het testen van nieuwe vaccins en antivirale middelen tegen ziekte door HEV3 het maximaal matig ongerief van maximaal 304 varkens?
2. De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De meerderheid van de DEC heeft in haar afweging meegewogen dat, wanneer het project zijn uiteindelijke doel haalt dit de gezondheid van mensen en varkens (one health principe/zoönose) kan ondersteunen bij een veel voorkomende subklinische infectie bij varkens.  
De meerderheid (6 leden) van de DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade-baten-analyse:
  - HEV3 infectie heeft bij gezonde volwassenen in de meeste gevallen een zelf-limiterend verloop. Mensen met een immuunziekte of een door medicijnen onderdrukt immuunsysteem kunnen na infectie een chronische hepatitis ontwikkelen. Vooral zij hebben een groot gezondheidsbelang met grote morele waarde wanneer er vaccins of therapeutische middelen beschikbaar zijn voor deze aandoening.
  - In de varkenshouderij zijn er het risico van besmetting van mensen (zoönose, volksgezondheidsbelang) en een economisch belang. Het gezondheidsbelang waardeert de DEC als een groot belang van reële morele waarde. Het economische belang is ook een groot belang, maar dit waardeert de DEC als van beperkte morele waarde.
  - De farmaceutische industrie heeft een economisch belang van beperkte morele waarde.
  - De onderzoeker heeft een reëel wetenschappelijk belang (kennis vergaren) dat de DEC waardeert als een belang van reële morele waarde.
  - De CRO heeft, omdat dit contract-research-onderzoek betreft, een economisch belang dat de DEC als een gering belang waardeert.
  - De varkens in de houderij (doeldieren) worden niet ziek maar moeten mogelijk wel gevaccineerd gaan worden. De DEC waardeert dit als zeer klein negatief belang/geen belang van beperkte morele waarde.
  - De proefdieren ervaren naar verwachting maximaal matig ongerief als gevolg van de handelingen en behandelingen in het project. De integriteit van de proefdieren in dit project wordt niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef. Het betreft grote aantallen proefdieren en de DEC waardeert het belang van de proefdieren als een groot belang van grote morele waarde.
3. Op basis van bovenstaande overwegingen zijn 6 leden van de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar het ontwikkelen en toepassen van een ziektemodel in varkens t.b.v. vaccins en therapeutische middelen tegen HEV3-infecties met maximaal matig ongerief voor maximaal 304 dieren, mits het ziektemodel in de praktijk ook veelvuldig zal worden gebruikt voor het toetsen van vaccins en antivirale middelen tegen HEV3. In zijn antwoorden heeft de onderzoeker aangegeven dat er een farmaceut heeft aangegeven een model te willen gebruiken, dat er nu niet is; de meerderheid van de DEC vindt dat voldoende onderbouwing voor de rechtvaardiging van het project. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag.  
De centrale morele vraag kan voor 6 leden van de DEC met "ja" beantwoord worden.  
2 leden van de DEC hebben zich van stemming onthouden.

## E. Advies

1. Advies aan de CCD:
  - De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden:
    - Het ziektemodel zal in de praktijk veelvuldig gebruikt gaan worden voor het toetsen van vaccins en antivirale middelen tegen HEV3. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
2. Onderstaande knelpunt/dilemma is naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies:
  - Bij één van de DEC-leden bestond twijfel over de vraag of farmaceutische bedrijven bereid zullen zijn een vaccin te ontwikkelen dat is bedoeld voor immuungecompromitteerde patiënten. Het gaat om een kwetsbare groep van relatief beperkte omvang die in het algemeen weinig of geen antistoffen aanmaakt na vaccinatie. En er zijn ook andere manieren om deze specifieke groep patiënten te beschermen tegen HEV3, o.a. door geen rauw varkensvlees te eten of niet in aanraking te komen met materialen die besmet zijn met rauw varkensvlees. Hetzelfde geldt voor antivirale medicijnen. Dan zou het infectiemodel ongebruikt op de plank kunnen blijven liggen. Dit DEC-lid heeft ook twijfels of veehouders zouden gaan vaccineren (kostenpost) tegen een infectie waar de varkens zelf geen last van hebben.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e  
5.1 lid2e

**Form**

**Project proposal**• This form should be used to write the project proposal of animal procedures.

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

**1 General information**

|     |  |   |
|-----|--|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 5.1 lid2h   |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment.  | 5.1 lid2h   |
| 1.3 | Provide the title of the project.  | Development of a Hepatis E genotype 3 animal model and use in vaccine and treatment studies in pigs |

**2 Categories**

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

**3 General description of the project**

### 3.1 Background

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

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

Hepatitis E virus (HEV) is an important cause of outbreaks and sporadic cases of viral hepatitis in humans in many developing tropical and subtropical countries. HEV infections in humans can vary from asymptomatic or mild disease with fever and nausea to acute hepatitis with symptoms indistinguishable from other types of acute viral hepatitis. HEV is the most important cause of clinical hepatitis in adults throughout Asia and in some European countries. It is estimated that two billion people have been infected with HEV with 14 million symptomatic cases and 300,000 deaths occurring annually around the world [1, 2] [3, 4]. The disease resulting from HEV infection occurs often in pregnant women and is characterized by moderately severe hepatitis that is self-limiting in most patients. However, in immune-compromised individuals, HEV can persist and cause chronic liver disease.

HEV is a positive-stranded RNA virus, which is the sole member of the genus *Hepevirus* in the family of *Hepeviridae*. HEV is a small, round non-enveloped particle of 27-34 nm with a genome approximately 7.2 kb in length. Based on the extensive genomic variability among HEV isolates, HEV sequences have been classified in four major genotypes (1, 2, 3 and 4), all belonging to a single serotype. The different HEV genotypes show a distinct geographical distribution. Genotypes 1 and 2 (HEV 1 and HEV 2) are restricted to humans and are prevalent in developing countries. Genotypes 3 and 4 (HEV 3 and HEV 4) are distributed worldwide, have a much wider host range and are considered to be zoonotic. Clinical cases of HEV in industrialized countries are increasingly caused by zoonotic genotypes HEV 3 and HEV 4 [5]. A recent EFSA report from 2017 [5] describes the recent situation of HEV infections in Europe and states, that "... the reported HEV clinical cases increased from 514 in 2005 to 5617 cases in 2015 with overall more than 21.000 cases reported in 22 EU countries between 2005 and 2017" and that "...more than 95% of the human infections were autochthonous, locally acquired (within the country of residence) due to infection with HEV-3 viruses". About 50% of the cases are hospitalized. According to RIVM information, in the Netherlands there were 160 to 300 cases per year from 2016 to 2020.

Many swine HEV isolates have been identified in both developing and industrialized countries. HEV 3 occurs worldwide, whereas HEV 4 is mainly seen in Asia. Although direct evidence of HEV transmission from humans to animals is lacking, both human and swine genotype 3 strains were experimentally demonstrated to infect pigs and there is a high level of genetic relatedness between HEV isolates obtained from humans and swine [6, 7]. In pigs, HEV infection occurs through the fecal-oral route and the virus first replicates in the gastrointestinal tract and subsequently spread systemically to the liver [8]. After replication in the liver, swine HEV is released to the gallbladder from hepatocytes and is then excreted in feces. Replicative negative-strand HEV RNA was detected in the liver, intestines and lymph nodes of experimentally infected pigs and viral RNA was detected in hepatocytes. There were no remarkable gross lesions and also in natural conditions pigs do not develop any signs of disease. The microscopic pictures were characterized by mild-to-moderate multi-focal lymphoplasmacytic hepatitis and mild focal hepatocellular necrosis [8].

Despite a growing awareness, hepatitis E virus (HEV) remains understudied and investigations have been historically hampered by the absence of efficient cell culture systems to obtain virus isolates, which can be used more standardized in animal studies. Due to this limitation, experimental infections are using infectious tissue or excretion materials from infected animals, which also limits comparative studies between virus strains. As a result, the pathogenesis of HEV infection and basic steps of the HEV life cycle are poorly understood. Major efforts have recently been made through the development of HEV infectious cDNA clones and cellular systems that significantly advanced HEV research [9]. The use of reverse genetic systems has demonstrated the generation of infectious virus from cloned cDNA by transfection of cultured cells and also in animal models. In pigs, the intrahepatic administered infectious clone of a human HEV 4 isolate resulted in a successful infection with subsequent RNA detection of HEV in the period after challenge [10].



Several animal species are susceptible to infection by human HEV strains and are used in animal studies. Based on transmission studies, rhesus monkeys and cynomolgus monkeys are considered the most suitable models for HEV studies[4]. However, despite production of efficient virus replication, nonhuman primate have limitations in reproducing the clinical and pathological aspects of hepatitis. Furthermore, limited animal resources, cost, and ethical considerations have limited the widespread use of nonhuman primate models in HEV research today. HEV can naturally infect pigs and therefore pigs are considered as one of the primary animal models for HEV infections in biomedical studies and are at the same time useful in target animal studies.

Also for humans, who are at risk, vaccination might be a critical tool to prevent infection. So far only one, in China registered HEV vaccine is available. This is a subunit vaccine based on the capsid protein of HEV 1 [11, 12]. In the veterinary field vaccination is considered a potentially successful approach to reduce the incidence of HEV in the pig population and reduce the zoonotic risk [12-14]. After natural infection, humans and also pigs develop HEV specific antibodies and also after vaccination with the Chinese vaccine antibodies are elicited and efficacy has been shown against HEV 4. The current vaccine effectively protects against symptomatic HEV 4 infection, however, protection is dependent on the height of the IgG titre and the duration of immunity post vaccination is limited [15]. Efficacy of the vaccine against HEV 3 is unknown. Thus new vaccines with a high and long-lasting efficacy against in Europe predominant HEV 3 infections are needed.

Current therapeutic options against HEV are limited to one unspecific antiviral, Ribavirin and cytokine treatments. Treatment with Ribavirin is off -label use and in only a limited number of patients successful. Therefore, therapeutic tools or HEV-specific antivirals to treat infections are missing and an animal model can be essential for ultimate testing the efficacy of the urgent needed new drugs in HEV 3 therapy.

In conclusion, a readily available animal model to study the underlying mechanism of acute hepatitis after HEV 3 infection is still lacking. With such a reproducible model of HEV new vaccine candidates for humans and pigs will be tested, and also used for evaluating the efficacy of antivirals and therapeutics against HEV infections in humans.

### 3.2 Purpose

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

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

- To establish an animal model in pigs for HEV infections using infectious copies from HEV strains
- to evaluate vaccines for humans and pigs (to be used in the current research project and in CRO projects)
- to evaluate antivirals and therapeutics against HEV infection (to be used in CRO projects)

These direct objectives will contribute to the development of strategies for the prevention and treatment of HEV3 infections in humans and to reduce the zoonotic risk by transmission from pigs to humans.

#### 3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

The approach to achieve the goal by using infectious clones to introduce a HEV infection in pigs has already been shown earlier with HEV 4 [10]. Therefore it is highly likely that the infection model for HEV 3 will work, especially as the international project collaborators have a strong experience of producing infectious cDNA clones from positive stranded RNA viruses and have already a HEV 3 clone derived from a severe, human case prepared. The virulence of this human isolate derived clone needs to be proven in the pig model. The international partner, but also our institute have long standing expertise with infections in pigs and also with all facets of research and diagnostics of HEV 3 infections in pigs.

Project partners are developing subunit vaccines against HEV 3 based on a vector-vaccine concept and immunogenicity and efficacy studies will be performed with such vaccines. The current rapid developments of nucleic acid based vaccines like mRNA vaccines make it very likely that research groups will address us in the case a successful model can be provided.

3.2.3 andere wetgeving  
X nee

### **3.3 Relevance**

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

---

#### 3.3.1

Even though some in vivo or in vitro models have been established for HEV there is a need for an animal experimental model that can reliably reproduce human disease using controlled exposure. There is no treatment available to control acute HEV, although monotherapy with ribavirin seems to elicit an efficient response in chronic HEV patients infected during organ transplantation. There are currently (outside China) no vaccines approved to control HEV, albeit some have been tested in clinical trials but their safety and efficacy needs further studies. Therefore, there is an unmet need for the identification of efficient vaccine candidates to HEV.

The research will contribute to the one-health approach to control HEV in pigs in order to minimize the proportion of pigs carrying HEV at the time of slaughter as requested in a recent EFSA biohazard report [[16].

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is

Stakeholders in this project are:

- patients suffering from acute or chronic infection with HEV3 and who need early therapeutic means like antivirals to reduce virus load
- immune compromised persons, who could benefit from preventive vaccines, which can only be developed when a reliable animal model is available
- the pig producing sector which needs for a responsible one-health approach means to prevent transmission to humans by for example vaccination.
- the pig as target species might benefit from vaccination as the role of subclinical HEV infections for other diseases is still unclear.
- the research organisation, which makes use of the animal model within current research projects, but also by making the animal model available for collaborations with and services for other academic and private partners

### **3.4 Research Strategy**

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

---

Swine are attractive animal models for human infectious diseases due to e.g. similarities in anatomy, physiology and size, availability of samples, and the similarity of the pig immune system to the human counterpart. With the continuous development of porcine immunological reagents to characterize both antigen presenting cells and lymphocytes, including tracking of virus specific T cell responses, meaningful mechanistic models for interpretation of experimental data are available to provide surrogate immunological endpoints that predict human in vivo outcomes.

Genotype 3 of HEV (HEV 3) is a pig virus, and it is expected, that the human infection can readily be compared in this model. Current virus isolates are of low virulence in pigs and therefore a model will be established by evaluating the virulence of infectious clones isolate from a severe disease human patient. The international project group has extensive experience in generating in vivo infectious cDNA clones of difficult-to-culture positive strand RNA viruses, and in adapting them to high titer growth in modified cultures. These models will be used for evaluations of promising new vaccines and therapeutics.

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

---

The lack of reproducible and reliable production of infectious virus in cell-culture systems has hampered the development of animal models for HEV 3. A recent study has shown that infectious clones of HEV 4 can infect pigs and result in virus proliferation and serological response [10] and a similar strategy will be followed in this project for HEV 3.

International collaborators, contributing to this project, have developed techniques to establish infectious clones of HEV viruses of various field isolates from severe HEV 3 infections in humans. These infectious clones will be used to establish the animal model after intrahepatic administration followed by challenge dose validation studies. Young pigs will be inoculated with the respective infectious clone either intravenously or by intrahepatic injection (under anaesthesia and with ultrasound guidance). The pigs will be followed for a period of three weeks and clinical signs, virus excretion and immunological and clinical-pathological measurements performed and thereafter extensive pathological examination.

If the model development results in a suitable animal model, in which typical clinical signs and morphological signs of hepatitis are expressed and reproduction and excretion of infectious virus can be measured, the established animal model will be used to study the immunogenicity and protection of two different subunit vaccines for use in humans and will also be made available to be used by other vaccine developers for the development of human and pig HEV 3 vaccines.

Vaccination studies will be performed in young pigs with vaccine constructs, which have shown immunogenicity either in pigs or other species. These studies will comprise two or three vaccinations in an interval of 2 to 4 weeks followed by a challenge infection and an post-challenge observation period of up to 6 weeks. Serological analysis of blood samples taken before and after vaccination and analysis of T-cell responses will be performed to assess the pre-challenge immune reaction and in the post-challenge period, and viremia and virus excretion after challenge infection as well as clinical-pathological and pathological examinations will be performed. To study vaccine efficacy under natural transmission conditions, protection after vaccination will also be tested in contact studies, where pigs will be infected with an infectious clone and co-housed with naive pigs. Here, especially virus propagation in gastro-intestinal tissue and liver and virus excretion will be studied and the efficacy of vaccines to protect against infection via the natural oro-faecal route will be examined.

The evaluation of new therapeutic approaches like antivirals are not part of our own research project, but the developed animal model will be made available to other research groups for pre-clinical testing of new candidates. For the evaluation of antivirals or therapeutics in vivo studies results of preceding in-vitro investigations will be requested and only successful in-vitro candidates will be tested in the pig model. Young pigs will be infected with the infectious clone and the antiviral efficacy will be tested by studying the reduction of signs of hepatitis like the reduced increase of liver enzymes and/or gene expression profiles in blood or liver tissue and the reduction in viremia, virus excretion and virus load in liver tissue and intestinal tract.

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

---

The development of the animal model with infectious clones of HEV 3 resulting in : viremia, faecal virus excretion and signs of hepatitis in clinical -chemistry (increase in liver enzymes AST, ALAT and  $\gamma$ GT) as well as liver pathology with manifestation of hepatitis will be the objective of the first step and is covered by animal procedure 3.4.4.1 (milestone 1: aforementioned criteria achieved -->go/otherwise no go for following studies).

Following studies (animal procedure 3.4.4.2.) to examine vaccine efficacy in experimentally and naturally (through transmission) infected animals or therapeutic approaches are dependent on the well characterized and reproducible animal model. Currently in our research project two vaccine studies are planned.

The model will be offered as contract research activity to academic and private partners for vaccine development and also to study efficacy of antiviral treatments. Here we expect to perform two

vaccine studies and two treatment studies in the project period. Therapy candidates and antivirals will only (go/no go) be tested a) if they have been shown to induce in-vitro viricidal activity (selection point) against HEV.

## References

1. Emerson, S.U. and R.H. Purcell, *Hepatitis E virus*. Rev Med Virol, 2003. **13**(3): p. 145-54.
2. Legrand-Abravanel, F., et al., *Hepatitis E virus genotype 3 diversity, France*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(1): p. 110-4.
3. Van der Poel, W.H.M., et al., *Knowledge gaps and research priorities in the prevention and control of hepatitis E virus infection*. Transbound Emerg Dis, 2018. **65 Suppl 1**: p. 22-29.
4. Kenney, S.P. and X.J. Meng, *Hepatitis E Virus: Animal Models and Zoonosis*. Annu Rev Anim Biosci, 2019. **7**: p. 427-448.
5. Meester, M., et al., *Infection dynamics and persistence of hepatitis E virus on pig farms - a review*. Porcine Health Manag, 2021. **7**(1): p. 16.
6. Feagins, A.R., et al., *Cross-species infection of specific-pathogen-free pigs by a genotype 4 strain of human hepatitis E virus*. J Med Virol, 2008. **80**(8): p. 1379-86.
7. Hazards, E.P.o.B., et al., *Public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen*. EFSA J, 2017. **15**(7): p. e04886.
8. Bouwknegt, M., et al., *The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation*. BMC Vet Res, 2009. **5**: p. 7.
9. Scholz, J., et al., *Reverse genetics approaches for hepatitis E virus and related viruses*. Curr Opin Virol, 2020. **44**: p. 121-128.
10. Cordoba, L., et al., *Rescue of a genotype 4 human hepatitis E virus from cloned cDNA and characterization of intergenotypic chimeric viruses in cultured human liver cells and in pigs*. J Gen Virol, 2012. **93**(Pt 10): p. 2183-2194.
11. Zhang, J., et al., *Long-term efficacy of a hepatitis E vaccine*. N Engl J Med, 2015. **372**(10): p. 914-22.
12. *Hepatitis E vaccine: WHO position paper, May 2015*. Wkly Epidemiol Rec, 2015. **90**(18): p. 185-200.
13. Wang, B. and X.J. Meng, *Hepatitis E virus: host tropism and zoonotic infection*. Curr Opin Microbiol, 2021. **59**: p. 8-15.
14. Opriessnig, T., et al., *Future perspectives on swine viral vaccines: where are we headed?* Porcine Health Manag, 2021. **7**(1): p. 1.
15. Kinast, V., et al., *Hepatitis E Virus Drug Development*. Viruses, 2019. **11**(6).
16. EFSA, *Public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen*. EFSA Journal, 2017. **15**(7): p. 4886.

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

| Serial number | Type of animal procedure              |
|---------------|---------------------------------------|
| 1             | Development of a HEV E disease model  |
| 2             | HEV vaccination and treatment studies |

Appendix  
Description animal procedures

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

### 1 General information

| 1.1           | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.                                  | 5.1 lid2h   |               |                          |   |                                      |  |
|---------------|---|---|---------------|--------------------------|---|--------------------------------------|--|
| 1.2           | Provide the name of the licenced establishment.   | 5.1 lid2h   |               |                          |   |                                      |  |
| 1.3           | List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | <table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="438 1008 933 1064">Serial number</th> <th data-bbox="933 1008 1423 1064">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="438 1064 933 1283">1</td> <td data-bbox="933 1064 1423 1283">Development of a HEV E disease model</td> </tr> </tbody> </table> | Serial number | Type of animal procedure | 1 | Development of a HEV E disease model |  |
| Serial number | Type of animal procedure  |   |               |                          |   |                                      |  |
| 1             | Development of a HEV E disease model  |   |               |                          |   |                                      |  |

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

This procedure will be used to establish the animal model for HEV3 infections in pigs by performing a proof of concept study, a dose refinement study and further studies to characterize the model in more detail by pathogenesis and immunological studies in the course of the HEV3 infection. To establish the infection model 4 to 10 week old pigs will be inoculated with infectious cDNA copies of the virus by various inoculation routes, i.e. either intravenous or into the liver tissue (intrahepatic) under visual control. At least for the latter procedure, pigs are anaesthetized by injection and inocula will be administered under ultra sound control. After inoculation pigs will be followed up to 6 weeks. After inoculation pigs will be examined clinically by visual examination and rectal temperature control daily (or twice daily) and viremia, white blood cell analysis (automated counting, FACS), clinical chemistry with specific focus on liver enzymes and also immune and inflammation related serum parameters will be examined. At the end of the observation period all pigs will be euthanized and undergo pathological examination and tissue will be collected for (immune)histological and virological examination. Primary outcomes of the study are viremia, virus excretion and signs of hepatitis, i.e. increased liver enzymes, systemic inflammation and signs of acute or chronic hepatitis (confirmed by histology). The established model will be further characterized in pathogenesis studies and by studying transmission to naive contact pigs to be able to study effects on the natural infection mode.

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

Inoculation of infectious materials and control materials:

- Intravenous inoculation: infectious materials will be administered once in max. 4 ml volume via ear vein catheter or via needle injection into the jugular vein; for the inoculation pigs can be anaesthetized if this is considered necessary to compare the i.v. administration route with the intrahepatic administration.
- Intrahepatic inoculation: infectious materials will be administered in anaesthetized pigs using an ultrasound-guided technique on four different sites of the liver with a maximal volume of 250 µl per site; anaesthesia will be performed by use of injection anaesthesia;

Sampling:

- Blood samples (heparin/EDTA/serum blood) will be collected before inoculation and after inoculation with a maximal volume of 10% of the circulating volume in a period of 4 weeks; after inoculation blood samples will be taken 2 to 4 times per week; for blood sampling pigs will be restrained.
- Faecal samples will be obtained during rectal temperature measurements about two times per week;

Clinical observation:

- After inoculation pigs will be examined twice daily by visual observation and findings recorded, observations will be increased as soon as severe clinical signs occur; note: HEV usually does not induce clinical symptoms, but the choice to use infectious copies of a human isolate from severely ill patient is expected to result in clinical disease signs, like reduced activity, reduced appetite, fever, abdominal pain due to liver swelling, but the degree of severity is not predictable.
- Rectal temperature will be taken once, and around inoculation twice daily without restraining
- Body weight will be determined weekly.

Necropsies: pigs will be euthanized and tissues obtained for virological and pathological examinations.

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

No statistical methods have been applied for the studies to establish the model, because we do not have experience with this model yet; there is only one study using three pigs per group to show infectivity of the infectious copy. Here we will start with a feasibility study with groups of six pigs to establish the model and as soon as there is sufficient evidence and information of the standard deviation in regard to the key parameters, the number of animals will be calculated based on these data for a following challenge dose defining study. The model to be used in vaccination or treatment studies should be statistically meaningful with maximally 10 animals per group. This is considered a critical point in the acceptance of the model

## **B. The animals**

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

Species: pigs; the pig is susceptible to infections with HEV (although without expressing clinical signs, but mild pathological changes in the liver) and due to similarities to the human immune system accepted as animal model;

Origin: SPF pig farm; pigs should be free of relevant porcine pathogens and serological negative for HEV

Life stage: 4 to 10 weeks of age; in field conditions pigs of this age are considered to be susceptible

Numbers: 64 pigs; for the first two studies (feasibility of animal model, challenge dose refinement study) four groups with 6 to 8 pigs per group are used and for later studies (pathogenesis/ model characterization) the numbers per group might be increased to 10 pigs per group, we expect to perform two studies with four groups per study. The exact number of animals will be calculated based on the data of the first studies and justified in the respective experimental plan and discussed with the IvD

## **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

## **D. Replacement, reduction, refinement**

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

Replacement: The use of in-vitro or other animal-free experimental methods to achieve a model to study the complexity of HEV infections, which enables to study pathogenesis and vaccine efficacy was evaluated, but considered to be not feasible and also not sufficient informative.

Reduction: A literature research on animal models for studies on HEV infection was performed in PubMed and Scopus and revealed that an approach as used here, has been used for HEV 4; In the exploratory phase, the number of animals to be used is reduced to the minimum, which provides sufficient information in regard to virus proliferation and host response to the infection. The results of this exploratory phase will determine the numbers of animals for the consecutive studies to be able to achieve meaningful results. The decision of the number of animals and the reasons for this decisions will be discussed in the respective experimental plan and with the IvD.

Refinement: A few animal models for HEV are described in various species, e.g. in non-human primates, rabbits, mouse, rats, and pigs. We chose to develop the animal model in the pig species, because the species is susceptible for (asymptomatic) infection, thus a natural host, and can be used for biomedical research as well as for target animal research (veterinary vaccines). The analytical tool box for pigs like tools for immunological investigations or gene expression studies in infected tissues are well developed in this species.

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

No adverse effects on the environment are expected and all studies with infectious cDNA clones will be performed in DM-III conditions as stated in the GMO permission GGO IG 20-076.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

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

n/a

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

Pigs will be kept in pens HEPA filtered pens with straw covered solid floors, pen environment is enriched with changing playing materials

### G. Location where the animals procedures are performed

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



### G. Location where the animals procedures are performed

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Pigs will be kept under anaesthesia during the intra-hepatic inoculation procedure to ensure correct administration of the inoculum. The inoculation is considered to induce similar or less pain as a liver biopsy does; in humans taking of liver biopsies is considered to induce mild pain and there usually no pain relieve methods are applied; in analogy, it is planned not to apply additional pain relieving methods after injection unless inoculation related distress is displayed.

### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

- handling of the animals
- the invasive technique due to the intrahepatic administration
- Single intravenous administration
- effects due to symptomatic infection.
- Repeated blood sampling

Explain why these effects may emerge.

Handling of the animals will result in stress. The intrahepatic injection will be done under anaesthesia and ultrasound control, the invasive technique and the intrahepatic administration with low volumes are expected not to induce pain in the period after anaesthesia. Single intravenous administration of inoculum is not expected to cause more pain as the injection pain itself, combined with the stress of restrain.

If hepatitis due to the infection occurs, the expected clinical signs are reduced activity, reduced appetite and weight loss, currently more clinical symptoms are not expected. Repeated blood sampling will induce some stress as repeated restraint during blood sampling will cause stress.

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

Injection anaesthesia will be used for the intrahepatic injection, all other procedures will be performed in the conscious animal by experienced personnel. To minimize stress the animals will be adapted to handling in the acclimatization period.

#### **J. Humane endpoints**

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

No > Continue with question K.

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

The intention of the procedure is to induce an infection, which leads to hepatitis. Acute severe hepatitis can result in pain due to liver swelling and liver inflammation. Pigs are known to be susceptible to HEV infections, but usually manifest only mild signs of hepatitis without any clinical disease signs; we expect that the induced hepatitis will result in signs of hepatitis confirmed by clinical chemistry and pathology, but do not expect severe clinical disease. As, currently we can only speculate on the severity of disease, the following humane endpoints are defined:

- Recumbent at two successive observation moments within 12 hours
- No feed intake for 24 hours
- Weight loss compared to inoculation time point of more than 15% (corrected for age dependent growth curve)

HEP's will be adapted and discussed with IvD, based on the growing experiences in the project.

Indicate the likely incidence.

25% (estimation without evidence)

#### **K. Classification of severity of procedures**

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

Intravenous Inoculation: mild  
Intraheaptic inocuation: moderate  
Due to disease: moderate  
Repeated blood sampling; moderate

Overall: moderate

**End of experiment**

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Animal will be euthanized and during gross pathology examination appropriate tissues will be collected for further analysis, i. e. at least virology and pathology examinations.

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

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

Yes

Appendix  
Description animal procedures

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

**1 General information**

|  |                            |   |
|--|----------------------------|---|
| <p>1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.</p>                                  | <p>5.1 lid2h</p>           |   |
| <p>1.2 Provide the name of the licenced establishment.</p>   | <p>5.1 lid2h</p>           |   |
| <p>1.3 List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</p> | <p>Serial number<br/>2</p> | <p>Type of animal procedure<br/>HEV vaccination and treatment studies</p> |

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In this procedure the established animal model for HEV3 infections in pigs is used to evaluate vaccine candidates for human vaccines and for new pig vaccines in target animal studies and to evaluate antivirals and drugs in biomedical studies.

Four to ten week old pigs will be vaccinated once or repeatedly (max. 3 times) in two to four week intervals depending on the vaccine type and at two to six weeks after the last vaccination the pigs will be inoculated with infectious cDNA copies of the virus by the inoculation routes, which was selected from the animal model studies, i.e. either intravenous or into the liver tissue. After vaccination pigs are examined for the occurrence of side effects and the development of immune responses (serological, T-cell responses);

For biomedical studies, i.e. studies to investigate the efficacy of anti-virals/therapeutics in the acute infection phase four to ten week old pigs will be treated with the investigational product, which is either administered once or repeatedly parenteral or by oral administration; only products will be tested which have been shown to be safe in safety studies [note: biomedical studies are not part of the research project, but expected to be requested on the basis of CRO activities or other academic cooperations].

After challenge inoculation with the infectious cDNA clone pigs will be followed up to 6 weeks. In vaccine studies additional non-vaccinated control groups may be used, by which the protection against natural transmission will be studied.

After inoculation pigs will be examined clinically by visual examination and rectal temperature control daily (or twice daily) and viremia, white blood cell analysis (automated counting, FACS), clinical chemistry with specific focus on liver enzymes and also immune and inflammation related serum parameters will be examined

At the end of the observation period all pigs will be euthanized and undergo pathological examination and tissue will be collected for (immune)histological and virological examination. Primary outcomes of the study are reduction in viremia and virus excretion and reduction in signs of hepatitis, i.e. change in liver enzyme content in blood, systemic inflammation and signs of acute or chronic hepatitis (confirmed by histology).

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

Treatment:

- Vaccination will be done one to three times and depending on the vaccine candidate this can be done by various routes, i.e. intramuscular (max. 2 ml/site), subcutaneous (max. 2 ml/site); intradermal (100 µl/site) or by mucosal vaccination (intranasal/oral).
- antivirals or drugs for treatment, which will be evaluated will be administered orally (once or by daily gavage) or by injection ones or maximum of three times;

Inoculation of infectious materials and control materials:

- Intravenous inoculation: infectious materials will be administered in max. 4 ml volume via ear vein catheter or via needle injection into the jugular vein; for the inoculation pigs can be anaesthetized if this is considered necessary to compare the i.v. administration route with the intrahepatic administration.

- Intrahepatic inoculation: infectious materials will be administered in anaesthetized pigs using an ultrasound-guided technique on four different sites of the liver with a maximal volume of 250 µl per site; anaesthesia will be performed by use of injection anaesthesia;

Sampling:

- Blood samples (heparin/EDTA/serum blood) will be collected from the jugular vein before inoculation and after inoculation with a maximal volume of 10% of the circulating volume in a period of 4 weeks; after inoculation blood samples will be taken 2 to 4 times per week; for blood sampling pigs will be restrained.

- Faecal samples will be obtained during rectal temperature measurements about two times per week;

Clinical observation:

- After inoculation pigs will be examined twice daily by visual observation and findings recorded, observations will be increased as soon as severe clinical signs occur; note: HEV usually does not induce clinical symptoms, but the choice to use infectious copies of a human isolate from severely ill patient is expected to result in clinical disease signs, like reduced activity, reduced appetite, fever, abdominal pain due to liver swelling, but the degree of severity is not predictable.

- Rectal temperature will be taken once, and around inoculation twice daily without restraining

- Body weight will be determined weekly.

Necropsies: pigs will be euthanized and tissues obtained for virological and pathological examinations.

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

No statistical methods have been applied for these studies and the numbers of animals per group depend on the established model, because we do not have experience with this model yet; based on the information from the model development studies on means and standard deviation of key parameters such as virus excretion, virus load, change in biochemical data or pathology data, the number of animals will be calculated based on these data. Key parameters can differ between the objectives of the vaccination or treatment studies and the effect size, (incl. power and probability) will be defined before. Based on the figures of the model development studies, it will be decided whether the objective is achievable. However, the model to be used should be statistically meaningful in vaccination and biomedical studies with maximally 10 animals per group. This is considered a critical point in the acceptance of the model. The exact numbers will be calculated based on the data of the established animal model and justified in the respective experimental plan and discussed with the IvD.

## **B. The animals**

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

Species: pigs; the pig is susceptible to infections with HEV (although without expressing clinical signs, but mild pathological changes in the liver) and due to similarities to the human immune system accepted as animal model;

Origin: SPF pig farm; pigs should be free of relevant porcine pathogens and serological negative for HEV

Estimated number: 240; It is expected that the availability of the animal model will stimulate requests from vaccine developers to investigate the immunogenicity and efficacy of new developed vaccine candidates; therefore we assume to perform 4 studies with about six treatment groups and a maximum number of 10 pigs per group

Life stage: 4 to 10 weeks of age; in field conditions pigs of this age are considered to be susceptible

## **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

### C. Re-use

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: The use of in-vitro or other animal-free experimental methods to achieve information on the immunogenicity of vaccines and the efficacy of vaccines or antivirals/drugs in the complexity of a HEV infections was evaluated, but considered to be not feasible and also not informative.

Reduction: A literature research on animal models for studies on HEV infection and vaccination was performed in PubMed and Scopus and used for the development of the animal model.

The results of this development phase determines the numbers of animals for the consecutive studies to be able to achieve meaningful results. The decision of the number of animals and the reasons for this decisions will be discussed in the respective experimental plan and with the IvD.

Refinement: A few animal models for HEV are described in various species, e.g. in non-human primates, rabbits, mouse, rats, and pigs. We chose to develop and use the animal model in the pig species, because the species is susceptible for (asymptomatic) infection, thus a natural host, and can be used for biomedical research as well as for target animal research (veterinary vaccines). The analytical tool box for pigs like tools for immunological investigations or gene expression studies in infected tissues are well developed in this species.

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

No adverse effects on the environment are expected and all studies with infectious cDNA clones will be performed in DM-III conditions as stated in the GMO permission GGO IG 20-076.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

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

n/a

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

Pigs will be kept in HEPA filtered pens with straw covered solid floors, pen environment is enriched with changing playing materials

### G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Pigs will be kept under anaesthesia during the intra-hepatic inoculation procedure to ensure correct administration of the inoculum. The inoculation is considered to induce similar or less pain as a liver biopsy does; in humans taking of liver biopsies is considered to induce mild pain and there usually no pain relieve methods are applied; in analogy, it is planned not to apply additional pain relieving methods after injection unless inoculation related distress is displayed.

### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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



## I. Other aspects compromising the welfare of the animals

- handling of the animals
- the invasive technique due to the intrahepatic administration
- Single intravenous administration
- effects due to symptomatic infection.
- Repeated blood sampling

Explain why these effects may emerge.

Handling of the animals will result in stress.

Vaccination can result in local site reactions, which can result in short lasting increase of body temperature or local swellings and in very exceptional situation to allergic shock like reactions. It will also lead to restrain stress during the vaccination procedure.

The intrahepatic injection for the injection of challenge materials will be done under anaesthesia and ultrasound control, this invasive technique and the intrahepatic administration with low volumes are expected not to induce pain in the period after anaesthesia.

Single intravenous administration of inoculum is not expected to cause more pain as the injection pain itself, combined with the stress of restrain.

If hepatitis due to the infection occurs, the expected clinical signs are reduced activity, reduced appetite and weight loss, currently more clinical symptoms are not expected.

Repeated blood sampling will induce some stress as repeated restrain during blood sampling will cause stress

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

To minimize stress the animals will be adapted to handling in the acclimatization period.

During the vaccination phase animals will be observed directly after vaccination (30 minutes) and if adverse, shock like reactions occur appropriately treated, additionally body temperatures and local site reactions will be observed and recorded and treated if necessary.

Injection anaesthesia will be used for the intrahepatic injection, if used, all other procedures will be performed in the conscious animal by experienced personnel.

## J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

The intention of the procedure is to induce an infection, which leads to hepatitis. Acute severe hepatitis can result in pain due to liver swelling and liver inflammation. Pigs are known to be susceptible to HEV infections, but usually manifest only mild signs of hepatitis without any clinical disease signs; we expect that the induced hepatitis will result in signs of hepatitis confirmed by clinical chemistry and pathology, but do not expect severe clinical disease. As, currently we can only speculate on the severity of disease, the following humane endpoints are defined:

- Recumbent at two successive observation moments within 12 hours
- No feed intake for 24 hours
- Weight loss compared to inoculation time point of more than 15% (corrected for age dependent growth curve)

HEP's will be adapted and discussed with IvD, based on the growing experiences in the project.

Indicate the likely incidence.

10% (estimation without evidence as currently no figures are available; we also take in account that vaccination/treatment is to a certain degree effective)

#### **K. Classification of severity of procedures**

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

Repeated Vaccination i.m. or intradermal: mild  
Intravenous Inoculation: mild  
Intraheaptic inocuation: moderate  
Due to disease: moderate  
Repeated blood sampling; moderate

Overall: moderate

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Animal will be euthanized and during gross pathology examination appropriate tissues will be collected for further analysis, i. e. at least virology and pathology examinations.

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

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

Yes

|  |   |
|--|---|
| Naam van het project   | Ontwikkeling van een hepatitis E genotype 3 diermodel voor vaccinatie en interventiestudies in varkens  |
| NTS-identificatiecode  | NTS-NL-620559 v.1   |
| Nationale identificatiecode van de NTS<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i> |   |
| Land   | Nederland   |
| Taal   | nl  |
| Indiening bij EU<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>                       | ja  |
| Duur van het project, uitgedrukt in maanden.                                   | 60  |
| Trefwoorden  | Hepatitis<br>vaccins<br>antivirale middelen<br>HEV<br>varken  |
| Doel(en) van het project   | Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Besmettelijke ziekten van de mens<br>Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Ziekten en aandoeningen van dieren |

#### DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

|   |  |
|---|--|
| Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).  | Hepatitis E virus veroorzaakt acute en chronische leverontsteking (Hepatitis E) met jaarlijks meerdere miljoenen infecties en ca. 300.000 doden wereldwijd. De meeste infecties komen voor in Azië, maar ook in Europa worden regelmatig gevallen gezien vooral bij patiënten met een verzwakt immuun systeem. Het virus komt voor in vier verschillende genotypen, waarbij de genotype 1 en 2 de meest belangrijke oorzaak van hepatitis E zijn en voornamelijk in Aziatische landen voorkomen. Het in Europa voorkomende genotype 3 (HEV 3) wordt ook als een veroorzaker van hepatitis in de mens gezien. HEV 3 komt veelvuldig in varkens voor en zowel de dieren als ook producten van varkens kunnen een risico voor overdracht naar de mens vormen. Omdat het varken ook een natuurlijk gastheer van HEV is, kan het een geschikt diermodel zijn. Een dergelijk diermodel is belangrijk voor vaccinonderzoek naar vaccins voor de mens als ook voor onderzoek naar behandeling bij het optreden van ziekte. Er bestaan nu in Europa geen vaccins tegen deze aandoening en het meest gebruikte medicijn ter behandelingen van zieke patiënten blijkt niet altijd werkzaam te zijn. Het virus is nauwelijks te kweken en daarom zijn dieren tot nu toe experimenteel alleen door gebruik van weefsel en faeces te infecteren. Daarmee zijn dierstudies moeilijk te standaardiseren. Zogenaemde infectieuze kopieën, die van genetisch materiaal van HEV gemaakt zijn, zijn succesvol voor de infectie met een andere HEV genotype (genotype 4) gebruikt en het is zeer waarschijnlijk dat een diermodel voor HEV 3 kan worden ontwikkeld en voor onderzoek naar vaccins tegen HEV 3 en naar behandeling van infecties met HEV genotype 3 te gebruiken. Doel van dit project is een reproduceerbaar diermodel van HEV 3 infecties in varkens te ontwikkelen en met dit model nieuwe vaccins voor mens of varken te testen en de werkzaamheid van antivirale middelen of andere medicatie ter behandeling van de ziekte te onderzoeken. |
| Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid | Dit onderzoek is gericht op de ontwikkeling van een geschikt diermodel om vervolgens nieuwe vaccins en nieuwe antivirale middelen voor de behandeling van hepatitis E patiënten te testen. Vaccins kunnen vooral voor mensen met een verzwakt immuunsysteem van belang zijn. Vaccinatie van varkens kan een geschikt middel zijn om HEV 3 vrije varkens te produceren en daarmee het risico van overdracht van dier op mens te verminderen.  |

tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

**VOORSPELDE SCHADE**

| <p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>  | <p>Bij de ontwikkeling van het diermodel wordt het infectieuze materiaal eenmalig door intraveneuze toediening of door directe injectie in de lever toegediend. Voor de toediening in de lever worden de dieren onder narcose gebracht en de injectie van kleine hoeveelheden in de lever onder zicht controle uitgevoerd. De resultaten van de modelontwikkelings-studies bepalen of de experimentele infectie tijdens de vaccinatie of behandeling studies intraveneus of in de lever worden uitgevoerd. Voor en na infectie worden bloedmonsters genomen om hoeveelheid virus in het bloed en veranderingen ten gevolge van een leverontsteking te kunnen meten (frequentie ca. 10x). Bij het testen van nieuwe vaccins zullen deze een of tot drie keer toe in de spier of in de huid worden toegediend. De behandeling met antivirale middelen zal of oraal via mond of slokdarm of door injectie in de spier worden uitgevoerd. Tijdens vaccinatie- of behandelstudies worden monsters voor en na behandeling genomen (max. 10 x).</p> |                |  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |   |     |   |   |     |   |
|--|--|----------------|--|------------------------------------|---------|-------------|----------------|-------------|-------|-------|---------|---|-----|---|---|-----|---|
| <p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p> | <p>Natuurlijke infecties met HEV 3 infecties in het varken door orale opname verlopen zonder klinische verschijnselen en alleen in het leverweefsel zijn daarbij lichte ontstekingen te vinden. In het hier boogde model is de infectieroute door de intraveneuze toediening of toediening direct in de lever anders dan onder normale omstandigheden en is het infectieuze materiaal afkomstig van ernstig zieke patiënten. Dit kan ertoe leiden, dat er een ernstiger vorm van leverontsteking op gaat treden en dat ook klinische verschijnselen kunnen ontstaan met gewichtsverlies, verminderde activiteit en pijn door zwelling van de lever. De handelingen aan de dieren als ook de toedieningen of het verzamelen van bloedmonsters zullen tevens kortdurend ongerief veroorzaken.</p>  |                |  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |   |     |   |   |     |   |
| <p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>                                 | <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Varkens (<i>Sus scrofa domestica</i>)</td> <td>304</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>304</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>  | Soort:         | Totaal aantal  | Geraamde aantallen naar ernstgraad |         |             |                | Terminaal   | Licht | Matig | Ernstig | Varkens ( <i>Sus scrofa domestica</i> ) | 304 | 0 | 0 | 304 | 0 |
| Soort:   | Totaal aantal  |                |  | Geraamde aantallen naar ernstgraad |         |             |                |             |       |       |         |   |     |   |   |     |   |
|  |  | Terminaal      | Licht  | Matig                              | Ernstig |             |                |             |       |       |         |   |     |   |   |     |   |
| Varkens ( <i>Sus scrofa domestica</i> )  | 304  | 0              | 0  | 304                                | 0       |             |                |             |       |       |         |   |     |   |   |     |   |
| <p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>   | <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>   | Soort:         | Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren |                                    |         | Hergebruikt | Teruggeplaatst | Geadopteerd |       |       |         |   |     |   |   |     |   |
| Soort:   | Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren   |                |  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |   |     |   |   |     |   |
|  | Hergebruikt  | Teruggeplaatst | Geadopteerd  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |   |     |   |   |     |   |
|  |  |                |  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |   |     |   |   |     |   |
| <p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>  | <p>Na afloop van de studiefase worden de dieren gedood om weefsel voor verder onderzoek naar aanwezigheid van virus en naar pathologische veranderingen te onderzoeken.</p>  |                |  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |   |     |   |   |     |   |

## TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

|   |   |
|---|---|
| <p><b>1. Vervanging</b><br/>Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>   | <p>Onderzoeken naar HEV infecties worden in het laboratorium in celculturen en ook in complexere cel systemen uitgevoerd, echter zijn het ziekteproces en de vermindering van virus en de reductie van pathologische veranderingen voor het testen van bescherming na vaccinatie alleen in een dierstudie te onderzoeken.</p>   |
| <p><b>2. Vermindering</b><br/>Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p> | <p>Bij het vaststellen van het aantal dieren is rekening gehouden met studies die eerder uitgevoerd zijn, waarbij of vergelijkbaar infectiemateriaal of geïnfecteerd weefsel is gebruikt. Daarnaast is het aantal dieren, dat voor behandeling- of vaccinatiestudies gebruikt wordt, zo berekend dat er medisch-biologisch relevante verschillen aangetoond worden.</p>   |
| <p><b>3. Verfijning</b><br/>Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>  | <p>Alle handelingen aan de dieren zoals intraveneuze bloedmonsternamen, intraveneuze toediening en intrahepatische toediening worden door ervaren personeel uitgevoerd. In de acclimatisatieperiode wordt erop gelet, dat de dieren gewend raken aan handelingen. In de infectiefase worden de dieren ten minste twee keer per dag beoordeeld en afhankelijk van de ziekte ontwikkeling zal dit vaker gedaan worden. Humane eindpunten zijn vastgelegd om onnodige verlenging van een pijnperiode te voorkomen.</p>   |
| <p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>  | <p>Het onderzoek wordt in jonge varkens uitgevoerd omdat deze diersoort bekend is, gevoelig te zijn voor een infectie met HEV 3. Op een groot deel van de Nederlandse varkensbedrijven zijn varkens geïnfecteerd met het virus en vormen daarom ook een mogelijke bron voor infectie voor de mens. De infectie in varkens verloopt meestal zonder ziekteverschijnselen, echter door de keuze van het infectiemateriaal is de verwachting dat in ons model ook een ontsteking in de lever op gaat treden, net als bij de mens. Door de ontwikkeling van nieuwe vaccins en het testen in varkens is de verwachting dat zowel vaccins voor de mens als ook voor varkens kunnen worden getest. Tevens kunnen op grond van grote overeenkomstigheden in de immunologische afweer en in andere orgaanfuncties tussen mens en varken nieuwe behandelingen tegen HEV infecties bij de mens worden getest.</p> |

**VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT**

|  |     |
|--|-----|
| Project geselecteerd voor BA?                                | nee |
| Termijn voor BA  |     |
| <b>Reden voor de beoordeling achteraf</b>                    |     |
| Bevat ernstige procedures                                    |     |
| Maakt gebruik van niet-menselijke primaten                   |     |
| Andere reden   |     |
| Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf |     |

**AANVULLENDE VELDEN**

|   |  |
|---|--|
| Nationaal veld 1<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>          |  |
| Nationaal veld 2<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>          |  |
| Nationaal veld 3<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>          |  |
| Nationaal veld 4<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>          |  |
| Nationaal veld 5<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>          |  |
| Startdatum project<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>        |  |
| Einddatum project<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>         |  |
| Goedkeuringsdatum project<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i> |  |
| ICD-code 1<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>                |  |
| ICD-code 2<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>                |  |
| ICD-code 3<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>                |  |
| Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem      |  |





## Advies aan CCD

### B

Datum 30 augustus 2021  
 Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202114785

Instelling: 5.1 lid2h  
 Onderzoeker: 5.1 lid2e  
 Project: Development of a Hepatis E genotype 3 animal model and use in vaccine and treatment  
 Aanvraagnummer: AVD202114785  
 Betreft: Nieuwe aanvraag  
 Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek

### 1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

| Proces                              | 5.2 lid1  |
|-------------------------------------|---|
| <p>1</p> <p>2</p> <p>3</p> <p>4</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- U geeft aan in het projectvoorstel getallen weer over het voorkomen van HEV 3 in Europa en Nederland. Kunt u ook iets zeggen over het aantal sterfgevallen <sup>1</sup> linkt aan HEV 3?</li> <li>- Bij de bijlagen, vraag B geeft u niet aan of u varkens van beide geslachten gebruikt of van één geslacht. Kunt u dit nog aanvullen? Bij het gebruik van één geslacht graag een onderbouwing waarom dit nodig is om de doelstellingen te behalen.</li> <li>- Bij de bijlagen, vraag D staat de vraag: "Explain what measures will be taken to minimize 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment." U gaat hier niet in op de maatregelen die u neemt om het lijden van de dieren zoveel mogelijk te vermijden. Kunt u dit alsnog doen?</li> <li>- U geeft bij vraag J van de bijlagen aan dat u niet verwacht dat de varkens ernstig ziek worden door de route van infectie. Toch geeft u daaronder aan dat verwacht wordt dat bij 25% een humaan eindpunt zal worden toegepast (10% in bijlage 2). <sup>4</sup> komt u aan zo'n hoog percentage als u niet verwacht dat <sup>5</sup> dieren ernstig ziek worden?</li> <li>- U heeft als beoogde startdatum 01-02-2021 ingevuld, terwijl uw aanvraag pas in april door ons ontvangen is. Wilt u de looptijd van uw</li> </ul> |

# Overzicht van opmerkingen bij 10. AdviesNotaCCD - d.d. 30-8-2021\_met opmerkingen.pdf

5.1 lid2e

Pagina: 1

- 
- Nummer: 1      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 2-9-2021 17:12:42  
(optioneel: in Nederland en wereldwijd) specifiek
- 
- Nummer: 2      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 2-9-2021 17:16:04  
Volgens mij is er niet ingekaderd hoe lang de proeven maximaal zullen duren (met ook op 2-4 bloedjes per week in bijlage 2 is het ongerief dus niet helemaal ingekaderd). 5.2 lid1
- 
- Nummer: 3      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 2-9-2021 17:13:35  
5.2 lid1 (zie samenvatting)
- 
- Nummer: 4      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 2-9-2021 17:13:47  
zie ook puntje onder samenvatting

|  |                                 |                  |                      |   |
|--|---------------------------------|------------------|----------------------|---|
| <p>aanvraag nog wijzigen? U hoeft ons daarvoor geen nieuw aanvraagformulier te sturen, een antwoord op deze vraag volstaat.</p> <p>Vragen NTS:</p> <p>- Het wordt uit de NTS niet duidelijk hoe groot het probleem van HEV type 3 is. De 300.000 doden en miljoenen infecties wereldwijd worden voornamelijk door andere types veroorzaakt. Kunt u cijfers geven hoeveel besmettingen en doden er door HEV type 3 veroorzaakt worden?</p> <p>- Het doel van de NTS is om het publiek te informeren over projecten waarvoor een vergunning is verleend. Daarom is de NTS in het Nederlands met een voor een breed publiek begrijpelijk taalgebruik. U gebruikt enkele moeilijke termen in de NTS, zoals intraveneuze en intrahepatische toediening, complexere cel systemen en pathologische veranderingen. Kunt u een nieuwe NTS sturen zonder moeilijke woorden, of waarin deze worden uitgelegd?</p> |                                 |                  |                      |   |
| <b>Naam proef</b>  | <b>Diersoort</b>                | <b>Stam</b>      | <b>Aantal dieren</b> | <b>Herkomst</b>                                   |
| <b>3.4.4.1. Development of a HEV E disease model</b>   |                                 |                  |                      |   |
|  | Varkens (Sus scrofa domesticus) | SPF vrije dieren | 64                   | <b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b> |
| <b>3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies</b>  |                                 |                  |                      |   |
|  | Varkens (Sus scrofa domesticus) | SPF vrije dieren | 240                  | <b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b> |

### Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

#### 3.4.4.1. Development of a HEV E disease model

Citaat: Pigs will be kept in HEPA filtered pens with straw covered solid floors, pen environment is enriched with changing playing materials

#### 3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies

Citaat: Pigs will be kept in HEPA filtered pens with straw covered solid floors, pen environment is enriched with changing playing materials

## Pagina: 2

---

Nummer: 1      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 2-9-2021 16:35:06  
3V sectie is ook vrij summier 5.2 lid1 .

---

Nummer: 2      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 2-9-2021 16:32:58  
ze mogen onder nadelige effecten ook even vermelden dat de dieren worden gedood

## **Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren**

### **3.4.4.1. Development of a HEV E disease model**

Varkens (*Sus scrofa domesticus*) Dit is niet te lezen in de aanvraag

### **3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies**

Varkens (*Sus scrofa domesticus*) Zie 3.4.4.1.

|  |   |
|--|---|
| <b>Locatie uitvoering experimenten</b> | - Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder.<br>- De volgende problemen met de vergunninghouder zijn bekend: Bij inspectie door de NVWA is gebleken dat deze instelling een melding heeft gedaan van een aanpassing, welke als wijziging ingediend had moeten worden. Daarnaast heeft de instelling een aanpassing niet gemeld. |
| <b>Maatschappij</b>                    | Er wordt verwacht dat het onderwerp in die mate politiek of maatschappelijk gevoelig is, dat eventuele extra communicatie uitingen nodig zijn. Het gaat om een vaccin tegen HEV 3, dat voornamelijk veroorzaakt wordt door het eten van rauw varkensvlees. Infecties zouden dus ook voorkomen kunnen worden door geen rauw varkensvlees te eten.            |

## **2 DEC advies**

|                   |   |
|-------------------|---|
| <b>DEC-advies</b> | <p>Citaten uit het DEC advies:</p> <p>A9 (vraag van DEC aan onderzoeker): Zullen varkenshouders wel bereid zijn om hun dieren te vaccineren tegen iets waar ze geen "last" van hebben?<br/>Antwoord: Er zijn wel farmaceuten bezig met het ontwikkelen van HEV3-vaccins maar dat die nog geen model hebben. Het gaat dan met name om vraag vanuit de humane gezondheid; daar is behoefte aan een vaccin. De onderzoeker is door een Deense en een Amerikaanse groep benaderd als modelleur om kennis te delen, een model te maken en de andere onderzoeksgroepen te ondersteunen.</p> <p>C8 (proefopzet): Ervaringen met HEV4 maken het slagen van de ontwikkeling van dit diermodel mogelijk. Het HEV4 model is echter nog niet in immuungecompromitteerde mensen getest. Het is dus onzeker of het HEV3 model voor deze doelgroep geschikt zal zijn.</p> <p>C9 (bijzondere categorieën): Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:</p> <ul style="list-style-type: none"><li><input type="checkbox"/> Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn); de dieren zijn uit</li></ul> |
|-------------------|---|



de commerciële houderij afkomstig.  
De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd.

C10 (huisvesting): De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU voor zover ze niet met HEV3 zijn besmet. Na besmetting moeten de dieren in een High Containment Unit gehuisvest worden waar, om technische redenen, niet volledig aan de eisen voor bedding kan worden voldaan.

C13 (HEP's): HEP's worden niet verwacht omdat een HEV3 infectie bij varkens doorgaans geen verschijnselen geeft. Echter, HEP's worden ook niet uitgesloten, omdat men met meer infectieus materiaal gaat werken en zijn om die reden toch geformuleerd en zullen steeds met de IvD worden besproken. De HEP's zijn in de ogen van de DEC voldoende omschreven.

C18 (geslachten): Er wordt niet aangegeven dat de dieren niet van beide geslachten in gelijke mate worden ingezet in de proeven.

Ethische afweging van de DEC:

1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt het ontwikkelen, en daarna toepassen, van een ziektemodel in varkens voor het testen van nieuwe vaccins en antivirale middelen tegen ziekte door HEV3 het maximaal matig ongerief van maximaal 304 varkens?

2. De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De meerderheid van de DEC heeft in haar afweging meegewogen dat, wanneer het project zijn uiteindelijke doel haalt dit de gezondheid van mensen en varkens (one health principe/zoönose) kan ondersteunen bij een veel voorkomende subklinische infectie bij varkens. De meerderheid (6 leden) van de DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade-baten-analyse:

- HEV3 infectie heeft bij gezonde volwassenen in de meeste gevallen een zelf-limiterend verloop. Mensen met een immuunziekte of een door medicijnen onderdrukt immuunsysteem kunnen na infectie een chronische hepatitis ontwikkelen. Vooral zij hebben een groot gezondheidsbelang met grote morele waarde wanneer er vaccins of therapeutische middelen beschikbaar zijn voor deze aandoening.
- In de varkenshouderij zijn er het risico van besmetting van mensen (zoönose, volksgezondheidsbelang) en een economisch belang. Het gezondheidsbelang waardeert de DEC als een groot belang van reële morele waarde. Het economische belang is ook een groot belang, maar dit waardeert de DEC als van beperkte morele waarde.

- De farmaceutische industrie heeft een economisch belang van beperkte morele waarde.
- De onderzoeker heeft een reëel wetenschappelijk belang (kennis vergaren) dat de DEC waardeert als een belang van reële morele waarde.
- De CRO heeft, omdat dit contract-research-onderzoek betreft, een economisch belang dat de DEC als een gering belang waardeert.
- De varkens in de houderij (doeldieren) worden niet ziek maar moeten mogelijk wel gevaccineerd gaan worden. De DEC waardeert dit als zeer klein negatief belang/geen belang van beperkte morele waarde.
- De proefdieren ervaren naar verwachting maximaal matig ongerief als gevolg van de handelingen en behandelingen in het project. De integriteit van de proefdieren in dit project wordt niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef. Het betreft grote aantallen proefdieren en de DEC waardeert het belang van de proefdieren als een groot belang van grote morele waarde.

3. Op basis van bovenstaande overwegingen zijn 6 leden van de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar het ontwikkelen en toepassen van een ziektemodel in varkens t.b.v. vaccins en therapeutische middelen tegen HEV3-infecties met maximaal matig ongerief voor maximaal 304 dieren, mits het ziektemodel in de praktijk ook veelvuldig zal worden gebruikt voor het toetsen van vaccins en antivirale middelen tegen HEV3. In zijn antwoorden heeft de onderzoeker aangegeven dat er een farmaceut heeft aangegeven een model te willen gebruiken, dat er nu niet is; de meerderheid van de DEC vindt dat voldoende onderbouwing voor de rechtvaardiging van het project. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag.

De centrale morele vraag kan voor 6 leden van de DEC met "ja" beantwoord worden.

2 leden van de DEC hebben zich van stemming onthouden.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

2 leden van de DEC hebben zich van stemming onthouden. Het is het Secretariaat niet duidelijk of dit is vanwege belangenverstrengeling of omdat ze het met het besluit niet eens waren.

De volgende dilemma's zijn signaleerd door de DEC:



|  |   |
|--|---|
|  | <p>Bij één van de DEC-leden bestond twijfel over de vraag of farmaceutische bedrijven bereid zullen zijn een vaccin te ontwikkelen dat is bedoeld voor immuungecompromitteerde patiënten. Het gaat om een kwetsbare groep van relatief beperkte omvang die in het algemeen weinig of geen antistoffen aanmaakt na vaccinatie. En er zijn ook andere manieren om deze specifieke groep patiënten te beschermen tegen HEV3, o.a. door geen rauw varkensvlees te eten of niet in aanraking te komen met materialen die besmet zijn met rauw varkensvlees. Hetzelfde geldt voor antivirale medicijnen. Dan zou het infectiemodel ongebruikt op de plank kunnen blijven liggen. Dit DEC-lid heeft ook twijfels of veehouders zouden gaan vaccineren (kostenpost) tegen een infectie waar de varkens zelf geen last van hebben.</p> |
|--|---|


### 3 Kwaliteit DEC advies

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| <b>Kwaliteit DEC-advies</b> |   |
|                             | <p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de onderwerpen waar de DEC vragen over heeft gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelvingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>U geeft aan dat twee leden van de DEC zich van stemming hebben onthouden. In het vervolg ziet de CCD graag terug wat hiervan de reden is.</p> <p>U geeft bij vraag C10 <span style="background-color: yellow;">[ar]</span><sup>1</sup> dat de huisvesting niet volgens de richtlijn is. In het vervolg ziet de CCD graag van de DEC of zij de reden hiervoor voldoende onderbouwd acht.</p> |

### 4 Inhoudelijke beoordeling

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| <b>Doelstelling</b><br>Doelstelling | <ul style="list-style-type: none"> <li>- To establish an animal model in pigs for HEV infections using infectious copies from HEV strains</li> <li>- to evaluate vaccines for humans and pigs (to be used in the current research project and in CRO projects)</li> <li>- to evaluate antivirals and therapeutics against HEV infection (to be used in CRO projects)</li> </ul> <p>These direct objectives will contribute to the development of strategies for the prevention and treatment of HEV3 infections in humans and to reduce the zoonotic risk by transmission from pigs to humans.</p> |
|-------------------------------------|--|

---

 Nummer: 1    Auteur: 5.1 lid2e    Onderwerp: Sticky Note    Datum: 2-9-2021 17:24:07  
bij C13 hadden ze ook wel even mogen ingaan op de 25% inschatting

|   |  |
|---|--|
| Wetenschappelijk en maatschappelijk belang  | <p>Even though some in vivo or in vitro models have been established for HEV there is a need for an animal experimental model that can reliably reproduce human disease using controlled exposure.</p> <p>There is no treatment available to control acute HEV, although monotherapy with ribavairin seems to elicit an efficient response in chronic HEV patients infected during organ transplantation. There are currently (outside China) no vaccines approved to control HEV, albeit some have been tested in clinical trials but their safety and efficacy needs further studies. Therefore, there is an unmet need for the identification of efficient vaccine candidates to HEV.</p> <p>The research will contribute to the one-health approach to control HEV in pigs in order to minimize the proportion of pigs carrying HEV at the time of slaughter as requested in a recent EFSA biohazard report [[16].</p> |
| Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang                                 | <p><b>5.2 lid1</b></p> <p>5.2 lid1 Wat mist is de grootte van het probleem en de verwachte opbrengsten, welke nu slecht zijn in te schatten.</p>   |
| <b>Wetenschappelijke kwaliteit</b><br>Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek | <p>Citaat C7 uit het DEC advies: De onderzoekers hebben technische kennis en ervaring op dit gebied en werken samen met internationale onderzoekers die veel ervaring hebben in dit werkveld.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvrager of het onderzoek.</p>  |

### 3V's

|            |  |
|------------|--|
| Vervanging |  |
|            | <p><b>3.4.4.1. Development of a HEV E disease model:</b> Citaat: The use of in-vitro or other animal-free experimental methods to achieve a model to study the complexity of HEV infections, which enables to study pathogenesis and vaccine efficacy was evaluated, but considered to be not feasible and also not sufficiently informative.</p>              |
|            | <p><b>3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies:</b> Citaat: The use of in-vitro or other animal-free experimental methods to achieve information on the immunogenicity of vaccines and the efficacy of vaccines or antivirals/drugs in the complexity of a HEV infections was evaluated, but considered to be not feasible and also not informative.</p> |



| Verminderen |  |
|-------------|--|
|             | <p><b>3.4.4.1. Development of a HEV E disease model:</b> Citaat: A literature research on animal models for studies on HEV infection was performed in PubMed and Scopus and revealed that an approach as used here, has been used for HEV 4; In the exploratory phase, the number of animals to be used is reduced to the minimum, which provides sufficient information in regard to virus proliferation and host response to the infection. The results of this exploratory phase will determine the numbers of animals for the consecutive studies to be able to achieve meaningful results. The decision of the number of animals and the reasons for this decisions will be discussed in the respective experimental plan and with the IVD.</p> |
|             | <p><b>3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies:</b> Citaat: A literature research on animal models for studies on HEV infection and vaccination was performed in PubMed and Scopus and used for the development of the animal model.<br/>The results of this development phase determines the numbers of animals for the consecutive studies to be able to achieve meaningful results. The decision of the number of animals and the reasons for this decisions will be discussed in the respective experimental plan and with the IVD.</p>  |

| Verfijnen |   |
|-----------|---|
|           | <p><b>3.4.4.1. Development of a HEV E disease model:</b> Citaat: A few animal models for HEV are described in various species, e.g. in non-human primates, rabbits, mouse, rats, and pigs. We chose to develop the animal model in the pig species, because the species is susceptible for (asymptomatic) infection, thus a natural host, and can be used for biomedical research as well as for target animal research (veterinary vaccines). The analytical tool box for pigs like tools for immunological investigations or gene expression studies in infected tissues are well developed in this species.</p> <p>No adverse effects on the environment are expected and all studies with infectious cDNA clones will be performed in DM-III conditions as stated in the GMO permission GGO IG 20-076.</p>          |
|           | <p><b>3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies:</b> Citaat: A few animal models for HEV are described in various species, e.g. in non-human primates, rabbits, mouse, rats, and pigs. We chose to develop and use the animal model in the pig species, because the species is susceptible for (asymptomatic) infection, thus a natural host, and can be used for biomedical research as well as for target animal research (veterinary vaccines). The analytical tool box for pigs like tools for immunological investigations or gene expression studies in infected tissues are well developed in this species.</p> <p>No adverse effects on the environment are expected and all studies with infectious cDNA clones will be performed in DM-III conditions as stated in the GMO permission GGO IG 20-076.</p> |

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>Hergebruik</b> | Er is geen sprake van hergebruik van dieren. |
|-------------------|--|

| Naam proef                                     | Worden de dieren gedood? | Doden volgens richtlijn? |
|--|--------------------------|--------------------------|
| 3.4.4.1. Development of a HEV E disease model  | Ja                       | volgens de richtlijn.    |
| 3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies | Ja                       | volgens de richtlijn.    |

---

Nummer: 1      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 2-9-2021 17:02:10

5.2 lid1      Ja ze zijn vatbaar en doeldier. Maar ze infecteren de dieren niet op een natuurlijke wijze, maar spuiten het goedje rechtstreeks in de bloedbaan of lever.

Ook dat van die toolbox voor immunologie en gen expressie begrijp ik niet, die zijn toch niet specifiek voor varkens?

Overigens gaan ze ook helemaal niet in op maatregelen voor het welzijn.

|   |   |  |
|---|---|--|
| <b>Naam proef</b>                                     |   |  |
| <b>3.4.4.1. Development of a HEV E disease model</b>  | HEP: 25% (estimation without evidence)  | <p>Citaat: The intention of the procedure is to induce an infection, which leads to hepatitis. Acute severe hepatitis can result in pain due to liver swelling and liver inflammation. Pigs are known to be susceptible to HEV infections, but usually manifest only mild signs of hepatitis without any clinical disease signs; we expect that the induced hepatitis will result in signs of hepatitis confirmed by clinical chemistry and pathology, but do not expect severe clinical disease. As, currently we can only speculate on the severity of disease, the following humane endpoints are defined:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Recumbent at two successive observation moments within 12 hours</li> <li>- No feed intake for 24 hours</li> <li>- Weight loss compared to inoculation time point of more than 15% (corrected for age dependent growth curve)</li> </ul> <p>HEP's will be adapted and discussed with IVD, based on the growing experiences in the project.</p> |
| Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )              | Ongerief: 100,0% Matig  |  |
| <b>3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies</b> | HEP: Citaat: 10% (estimation without evidence as currently no figures are available; we also take in account that vaccination/treatment is to a certain degree effective) | Zie 3.4.4.1.   |
| Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )              | Ongerief: 100,0% Matig  |  |

## 5 Samenvatting

# 5.2 lid 1



De dieren worden niet volledig volgens de richtlijn gehouden. Na infectie worden de dieren in HEPA gefilterde units gehouden met aangepaste bedding. De DEC heeft hier een waarde oordeel over gegeven. **5.2 lid1**

De aanvrager heeft niet aangegeven of dieren van beide geslachten worden gebruikt, indien de CCD nog vragen wil stellen stelt het Secretariaat voor dit nog na te vragen.

De aanvrager geeft aan niet te verwachten dat de dieren ernstige ziekteverschijnselen ontwikkelen maar geeft wel aan dat bij maximaal 25% van de dieren een HEP zal worden toegepast (10% in bijlage 2). Indien de CCD nog vragen wil stellen stelt het Secretariaat voor de aanvrager te vragen dit verder te onderbouwen.

**5.2 lid1** Enerzijds is HEV 3 een infectie die in geringe mate voorkomt in Europa, met in Nederland 160-300 gedocumenteerde gevallen per jaar. Het betreft voornamelijk mensen met een verzwakt immuunsysteem. Anderzijds kan een infectie ook voorkomen worden door rauw varkensvlees te vermijden, er is dus als het ware een alternatief. Daarnaast is het niet duidelijk of een mogelijk vaccin voldoende werkzaam zou zijn bij mensen met een verzwakt immuunsysteem of dat varkenshouders hun varkens zouden vaccineren tegen een virus waar de dieren zelf geen last van hebben, om een kleine groep mensen te beschermen.

**5.2 lid1**

**6 Voorstel besluit incl. voorstel aeldiaheidsduur van de veraunning**

**5.2 lid1**

# Pagina: 11

---

Nummer: 1      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 2-9-2021 17:07:15  
5.2 lid1

Ook moeten de symptomen van ernstig ongerief en specifiek van de ziekte als HEPs worden meegenomen, die moeten bekend zijn.

---

Nummer: 2      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 2-9-2021 17:16:04  
goed verwoord! had het zelf niet beter kunnen zeggen ;)

↻ Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 2-9-2021 17:16:15  
misschien ook even verwijzen naar dEC discussie

---

Nummer: 3      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 2-9-2021 16:48:27  
Misschien toevoegen. Deze punten maken dat de opbrengsten van het project onzeker zijn.

---

Nummer: 4      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 2-9-2021 17:29:22  
evt ook vermindering

---

! Nummer: 5      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Highlight      Datum: 2-9-2021 17:28:48  
het belang en de mogelijke opbrengsten

---

Nummer: 6      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 2-9-2021 17:29:46  
op basis van een negatieve schade baten analyse

---

Nummer: 7      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 2-9-2021 17:30:54  
5.2 lid1

---

[Redacted]

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.



# Advies aan CCD

**B**

Datum 03 september 2021  
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202114785

Instelling: 5.1 lid2h  
Onderzoeker: 5.1 lid2e  
Project: Development of a Hepatis E genotype 3 animal model and use in vaccine and treatment  
Aanvraagnummer: AVD202114785  
Betreft: Nieuwe aanvraag  
Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek

## 1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

|               |   |
|---------------|---|
| <b>Proces</b> | <p>5.2 lid1</p> <p>- U geeft in het projectvoorstel getallen weer over het voorkomen van HEV 3 in Europa en Nederland. Kunt u ook iets zeggen over het aantal sterfgevallen, wereldwijd en in Nederland specifiek, gelinkt aan HEV 3?</p> <p>- Bij de bijlagen, onder A, beschrijft u niet hoe lang de experimenten maximaal duren voor de varkens. Kunt u dit nog aangeven? Dit is voor de CCD nodig om een goede inschatting van het ongerief te kunnen maken.</p> <p>- Bij de bijlagen, vraag B geeft u niet aan of u varkens van beide geslachten gebruikt of van één geslacht. Kunt u dit nog aanvullen? Bij het gebruik van één geslacht graag ook een onderbouwing geven waarom dit nodig is om de doelstellingen te behalen.</p> <p>- Kunt u bij de bijlagen, onder vraag D dieper ingaan op vervanging? U geeft aan dat u alternatieven heeft onderzocht en dat deze niet haalbaar waren. Kunt u toevoegen welke alternatieven er beschikbaar zijn en waarom deze niet kunnen bijdragen aan het behalen van de doelstellingen van dit project?</p> <p>- Bij de bijlagen, vraag D staat de vraag: "Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment." U gaat hier niet in op de maatregelen die u neemt om het lijden van de dieren zoveel mogelijk te vermijden. Kunt u dit</p> |
|---------------|---|

alsnog doen?

- Bij vraag J geeft u algemene humane eindpunten. Kunt u ook humane eindpunten formuleren die specifiek bij deze infectie zouden kunnen passen? U geeft aan dat de dieren maximaal matig ongerief zullen ondergaan, de humane eindpunten moeten zo gekozen zijn dat ernstig ongerief wordt uitgesloten.

- Ook geeft u bij vraag J van de bijlagen aan dat u niet verwacht dat de varkens ernstig ziek worden door de route van infectie. Toch geeft u daaronder aan dat verwacht wordt dat bij 25% een humaan eindpunt zal worden toegepast (10% in bijlage 2). Hoe komt u aan zo'n hoog percentage als u niet verwacht dat de dieren ernstig ziek worden?

- U heeft als beoogde startdatum 01-02-2021 ingevuld, terwijl uw aanvraag pas in april door ons ontvangen is. Wilt u de looptijd van uw aanvraag nog wijzigen? U hoeft ons daarvoor geen nieuw aanvraagformulier te sturen, een antwoord op deze vraag volstaat.

Vragen NTS:

- Het wordt uit de NTS niet duidelijk hoe groot het probleem van HEV type 3 is. De 300.000 doden en miljoenen infecties wereldwijd worden voornamelijk door andere types veroorzaakt. Kunt u cijfers geven hoeveel besmettingen en doden er door HEV type 3 veroorzaakt worden?

- Het doel van de NTS is om het publiek te informeren over projecten waarvoor een vergunning is verleend. Daarom is de NTS in het Nederlands met een voor een breed publiek begrijpelijk taalgebruik. U gebruikt enkele moeilijke termen in de NTS, zoals faeces, intraveneuze en intrahepatische toediening, complexere cel systemen en pathologische veranderingen. Kunt u in de nieuwe versie van de NTS eenvoudiger taal gebruiken of moeilijke termen uitleggen?

- Kunt u de secties over de 3V's aanvullen? Er is onvoldoende inzicht in waarom er dierproeven nodig zijn, waarom er niet met minder dieren gewerkt kan worden en waarom dit de meest verfijnde opzet is.

- Kunt u onder "expected impacts/adverse effects" nog toevoegen dat de dieren gedood worden in het kader van de proef?

| Naam proef  | Diersoort                                | Stam             | Aantal dieren | Herkomst  |
|---|--|------------------|---------------|---|
| <b>3.4.4.1. Development of a HEV E disease model</b>  |  |                  |               |   |
|   | Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> ) | SPF vrije dieren | 64            | <b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b> |
| <b>3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies</b> |  |                  |               |   |
|   | Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> ) | SPF vrije dieren | 240           | <b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b> |

### Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

#### 3.4.4.1. Development of a HEV E disease model

Citaat: Pigs will be kept in HEPA filtered pens with straw covered solid floors, pen environment is enriched with changing playing materials

#### 3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies

Citaat: Pigs will be kept in HEPA filtered pens with straw covered solid floors, pen environment is enriched with changing playing materials

### Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

#### 3.4.4.1. Development of a HEV E disease model

Varkens (*Sus scrofa domesticus*) Dit is niet beschreven in de aanvraag

#### 3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies

Varkens (*Sus scrofa domesticus*) Zie 3.4.4.1.

|  |   |
|--|---|
| <b>Locatie uitvoering experimenten</b> | - Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder.<br>- De volgende problemen met de vergunninghouder zijn bekend: Bij inspectie door de NVWA is gebleken dat deze instelling een melding heeft gedaan van een aanpassing, welke als wijziging ingediend had moeten worden. Daarnaast heeft de instelling een aanpassing niet gemeld. |
| <b>Maatschappij</b>                    | Er wordt verwacht dat het onderwerp in die mate politiek of maatschappelijk gevoelig is, dat eventuele extra communicatie uitingen nodig zijn. Het gaat om een vaccin tegen HEV 3, dat voornamelijk veroorzaakt wordt door het eten van rauw varkensvlees. Infecties zouden dus ook voorkomen kunnen worden door geen rauw varkensvlees te eten.            |

## 2 DEC advies

|                   |   |
|-------------------|---|
| <b>DEC-advies</b> | <p>Citaten uit het DEC advies:</p> <p>A9 (vraag van DEC aan onderzoeker): Zullen varkenshouders wel bereid zijn om hun dieren te vaccineren tegen iets waar ze geen "last" van hebben?</p> <p>Antwoord: Er zijn wel farmaceuten bezig met het ontwikkelen van HEV3-vaccins maar dat die nog geen model hebben. Het gaat dan met name om vraag vanuit de humane gezondheid; daar is behoefte aan een vaccin. De onderzoeker is door een Deense en een Amerikaanse groep benaderd als modelleur om kennis te delen, een model te maken en de andere onderzoeksgroepen te ondersteunen.</p> <p>C8 (proefopzet): Ervaringen met HEV4 maken het slagen van de ontwikkeling van dit diermodel mogelijk. Het HEV4 model is echter nog niet in immuungecompromitteerde mensen getest. Het is dus onzeker of het HEV3 model voor deze doelgroep geschikt zal zijn.</p> <p>C9 (bijzondere categorieën): Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:</p> <ul style="list-style-type: none"><li><input type="checkbox"/> Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn); de dieren zijn uit de commerciële houderij afkomstig.</li></ul> <p>De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd.</p> <p>C10 (huisvesting): De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU voor zover ze niet met HEV3 zijn besmet. Na besmetting moeten de dieren in een High Containment Unit gehuisvest worden waar, om technische redenen, niet volledig aan de eisen voor bedding kan worden voldaan.</p> <p>C13 (HEP's): HEP's worden niet verwacht omdat een HEV3 infectie bij varkens doorgaans geen verschijnselen geeft. Echter, HEP's worden ook niet uitgesloten, omdat men met meer infectieus materiaal gaat werken en zijn om die reden toch geformuleerd en zullen steeds met de IvD worden besproken. De HEP's zijn in de ogen van de DEC voldoende omschreven.</p> <p>C18 (geslachten): Er wordt niet aangegeven dat de dieren niet van beide geslachten in gelijke mate worden ingezet in de proeven.</p> <p>Ethische afweging van de DEC:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt het</li></ol> |
|-------------------|---|

ontwikkelen, en daarna toepassen, van een ziektemodel in varkens voor het testen van nieuwe vaccins en antivirale middelen tegen ziekte door HEV3 het maximaal matig ongerief van maximaal 304 varkens?

2. De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De meerderheid van de DEC heeft in haar afweging meegewogen dat, wanneer het project zijn uiteindelijke doel haalt dit de gezondheid van mensen en varkens (one health principe/zoönose) kan ondersteunen bij een veel voorkomende subklinische infectie bij varkens. De meerderheid (6 leden) van de DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade-baten-analyse:

- HEV3 infectie heeft bij gezonde volwassenen in de meeste gevallen een zelf-limiterend verloop. Mensen met een immuunziekte of een door medicijnen onderdrukt immuunsysteem kunnen na infectie een chronische hepatitis ontwikkelen. Vooral zij hebben een groot gezondheidsbelang met grote morele waarde wanneer er vaccins of therapeutische middelen beschikbaar zijn voor deze aandoening.
- In de varkenshouderij zijn er het risico van besmetting van mensen (zoönose, volksgezondheidsbelang) en een economisch belang. Het gezondheidsbelang waardeert de DEC als een groot belang van reële morele waarde. Het economische belang is ook een groot belang, maar dit waardeert de DEC als van beperkte morele waarde.
- De farmaceutische industrie heeft een economisch belang van beperkte morele waarde.
- De onderzoeker heeft een reëel wetenschappelijk belang (kennis vergaren) dat de DEC waardeert als een belang van reële morele waarde.
- De CRO heeft, omdat dit contract-research-onderzoek betreft, een economisch belang dat de DEC als een gering belang waardeert.
- De varkens in de houderij (doeldieren) worden niet ziek maar moeten mogelijk wel gevaccineerd gaan worden. De DEC waardeert dit als zeer klein negatief belang/geen belang van beperkte morele waarde.
- De proefdieren ervaren naar verwachting maximaal matig ongerief als gevolg van de handelingen en behandelingen in het project. De integriteit van de proefdieren in dit project wordt niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef. Het betreft grote aantallen proefdieren en de DEC waardeert het belang van de proefdieren als een groot belang van grote morele waarde.

3. Op basis van bovenstaande overwegingen zijn 6 leden van de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar het ontwikkelen en toepassen van een ziektemodel in varkens t.b.v. vaccins en therapeutische middelen tegen HEV3-infecties met maximaal matig ongerief voor maximaal 304 dieren, mits het ziektemodel in de praktijk ook veelvuldig zal worden gebruikt voor het toetsen van vaccins en



antivirale middelen tegen HEV3. In zijn antwoorden heeft de onderzoeker aangegeven dat er een farmaceut heeft aangegeven een model te willen gebruiken, dat er nu niet is; de meerderheid van de DEC vindt dat voldoende onderbouwing voor de rechtvaardiging van het project. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag.

De centrale morele vraag kan voor 6 leden van de DEC met "ja" beantwoord worden.

2 leden van de DEC hebben zich van stemming onthouden.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

2 leden van de DEC hebben zich van stemming onthouden. **5.2 lid1**

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

Bij één van de DEC-leden bestond twijfel over de vraag of farmaceutische bedrijven bereid zullen zijn een vaccin te ontwikkelen dat is bedoeld voor immuungecompromitteerde patiënten. Het gaat om een kwetsbare groep van relatief beperkte omvang die in het algemeen weinig of geen antistoffen aanmaakt na vaccinatie. En er zijn ook andere manieren om deze specifieke groep patiënten te beschermen tegen HEV3, o.a. door geen rauw varkensvlees te eten of niet in aanraking te komen met materialen die besmet zijn met rauw varkensvlees. Hetzelfde geldt voor antivirale medicijnen. Dan zou het infectiemodel ongebruikt op de plank kunnen blijven liggen. Dit DEC-lid heeft ook twijfels of veehouders zouden gaan vaccineren (kostenpost) tegen een infectie waar de varkens zelf geen last van hebben.

### 3 Kwaliteit DEC advies

| Kwaliteit DEC-advies |  |
|----------------------|--|
|                      | <p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de onderwerpen waar de DEC vragen over heeft gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u over het algemeen een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>U geeft aan dat twee leden van de DEC zich van stemming hebben onthouden. In het vervolg ziet de CCD graag terug wat hiervan de reden is.</p> <p>U geeft bij vraag C10 aan dat de huisvesting niet volgens de richtlijn is. In het vervolg ziet de CCD graag van de DEC of zij de reden hiervoor voldoende onderbouwd acht.</p> <p>U heeft de aanvrager vragen gesteld over de humane eindpunten, die in principe niet verwacht worden maar ook niet kunnen worden uitgesloten. De aanvrager geeft echter in bijlage 1 dat maximaal 25% van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken. Onder C13 heeft u dit hoge percentage niet vermeld. Het zou de CCD hebben geholpen in de beoordeling wanneer u had aangegeven of dit percentage realistisch is ingeschat of niet.</p> |

### 4 Inhoudelijke beoordeling

| Doelstelling |  |
|--------------|--|
| Doelstelling | <ul style="list-style-type: none"><li>- To establish an animal model in pigs for HEV infections using infectious copies from HEV strains</li><br/><li>- to evaluate vaccines for humans and pigs (to be used in the current research project and in CRO projects)</li><br/><li>- to evaluate antivirals and therapeutics against HEV infection (to be used in CRO projects)</li></ul> <p>These direct objectives will contribute to the development of strategies for the prevention and treatment of HEV3 infections in humans and to reduce the zoonotic risk by transmission from pigs to humans.</p> |

|  |  |
|--|--|
| Wetenschappelijk en maatschappelijk belang   | <p>Even though some in vivo or in vitro models have been established for HEV there is a need for an animal experimental model that can reliably reproduce human disease using controlled exposure.</p> <p>There is no treatment available to control acute HEV, although monotherapy with ribavairin seems to elicit an efficient response in chronic HEV patients infected during organ transplantation. There are currently (outside China) no vaccines approved to control HEV, albeit some have been tested in clinical trials but their safety and efficacy needs further studies. Therefore, there is an unmet need for the identification of efficient vaccine candidates to HEV.</p> <p>The research will contribute to the one-health approach to control HEV in pigs in order to minimize the proportion of pigs carrying HEV at the time of slaughter as requested in a recent EFSA biohazard report [[16].</p> |
| Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang  | <p><b>5.2 lid1</b> [redacted] at mist is de grootte van het probleem en de verwachte opbrengsten, welke nu slecht zijn in te schatten.</p>   |
| <p><b>Wetenschappelijke kwaliteit</b><br/>Kwaliteit aanvrager/onderzoeksgroep en onderzoek</p> | <p>Citaat C7 uit het DEC advies: De onderzoekers hebben technische kennis en ervaring op dit gebied en werken samen met internationale onderzoekers die veel ervaring hebben in dit werkveld.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvrager of het onderzoek.</p>  |

### 3V's

|            |  |
|------------|--|
| Vervanging |  |
|            | <p><b>3.4.4.1. Development of a HEV E disease model:</b> Citaat: The use of in-vitro or other animal-free experimental methods to achieve a model to study the complexity of HEV infections, which enables to study pathogenesis and vaccine efficacy was evaluated, but considered to be not feasible and also not sufficient informative.</p>                |
|            | <p><b>3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies:</b> Citaat: The use of in-vitro or other animal-free experimental methods to achieve information on the immunogenicity of vaccines and the efficacy of vaccines or antivirals/drugs in the complexity of a HEV infections was evaluated, but considered to be not feasible and also not informative.</p> |

|             |  |
|-------------|--|
| Verminderen |  |
|             | <p><b>3.4.4.1. Development of a HEV E disease model:</b> Citaat: A literature research on animal models for studies on HEV infection was performed in PubMed and Scopus and revealed that an approach as used here, has been used for HEV 4; In the exploratory phase, the number of animals to be used is reduced to the minimum, which provides sufficient information in regard to virus proliferation and host response to the infection. The results of this exploratory phase will determine the numbers of animals for the consecutive studies to be able to achieve meaningful results. The decision of the number of animals and the reasons for this decisions will be discussed in the respective experimental plan and with the IvD.</p> |
|             | <p><b>3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies:</b> Citaat: A literature research on animal models for studies on HEV infection and vaccination was performed in PubMed and Scopus and used for the development of the animal model.</p> <p>The results of this development phase determines the numbers of animals for the consecutive studies to be able to achieve meaningful results. The decision of the number of animals and the reasons for this decisions will be discussed in the respective experimental plan and with the IvD.</p>   |

|           |   |
|-----------|---|
| Verfijnen |   |
|           | <p><b>3.4.4.1. Development of a HEV E disease model:</b> Citaat: A few animal models for HEV are described in various species, e.g. in non-human primates, rabbits, mouse, rats, and pigs. We chose to develop the animal model in the pig species, because the species is susceptible for (asymptomatic) infection, thus a natural host, and can be used for biomedical research as well as for target animal research (veterinary vaccines). The analytical tool box for pigs like tools for immunological investigations or gene expression studies in infected tissues are well developed in this species.</p> <p>No adverse effects on the environment are expected and all studies with infectious cDNA clones will be performed in DM-III conditions as stated in the GMO permission GGO IG 20-076.</p>          |
|           | <p><b>3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies:</b> Citaat: A few animal models for HEV are described in various species, e.g. in non-human primates, rabbits, mouse, rats, and pigs. We chose to develop and use the animal model in the pig species, because the species is susceptible for (asymptomatic) infection, thus a natural host, and can be used for biomedical research as well as for target animal research (veterinary vaccines). The analytical tool box for pigs like tools for immunological investigations or gene expression studies in infected tissues are well developed in this species.</p> <p>No adverse effects on the environment are expected and all studies with infectious cDNA clones will be performed in DM-III conditions as stated in the GMO permission GGO IG 20-076.</p> |

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>Hergebruik</b> | Er is geen sprake van hergebruik van dieren. |
|-------------------|--|

| <b>Naam proef</b>                              | <b>Worden de dieren gedood?</b> | <b>Doden volgens richtlijn?</b> |
|--|---------------------------------|---------------------------------|
| 3.4.4.1. Development of a HEV E disease model  | Ja                              | volgens de richtlijn.           |
| 3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies | Ja                              | volgens de richtlijn.           |

|   |   |  |
|---|---|--|
| <b>Naam proef</b>                                     |   |  |
| <b>3.4.4.1. Development of a HEV E disease model</b>  | HEP: 25% (estimation without evidence)  | <p>Citaat: The intention of the procedure is to induce an infection, which leads to hepatitis. Acute severe hepatitis can result in pain due to liver swelling and liver inflammation. Pigs are known to be susceptible to HEV infections, but usually manifest only mild signs of hepatitis without any clinical disease signs; we expect that the induced hepatitis will result in signs of hepatitis confirmed by clinical chemistry and pathology, but do not expect severe clinical disease. As, currently we can only speculate on the severity of disease, the following humane endpoints are defined:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Recumbent at two successive observation moments within 12 hours</li> <li>- No feed intake for 24 hours</li> <li>- Weight loss compared to inoculation time point of more than 15% (corrected for age dependent growth curve)</li> </ul> <p>HEP's will be adapted and discussed with IvD, based on the growing experiences in the project.</p> |
| Varkens (Sus scrofa domesticus)                       | Ongerief: 100,0% Matig  |  |
| <b>3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies</b> | HEP: Citaat: 10% (estimation without evidence as currently no figures are available; we also take in account that vaccination/treatment is to a certain degree effective) | Zie 3.4.4.1.   |
| Varkens (Sus scrofa domesticus)                       | Ongerief: 100,0% Matig  |  |

## 5 Samenvatting

### 5.2 lid1



De dieren worden niet volledig volgens de richtlijn gehouden. Na infectie worden de dieren in HEPA gefilterde units gehouden met aangepaste bedding. De DEC heeft hier geen waarde oordeel over gegeven. **5.2 lid1**

De aanvrager heeft niet aangegeven of dieren van beide geslachten worden gebruikt, indien de CCD nog vragen wil stellen stelt het Secretariaat voor dit nog na te vragen.

De aanvrager geeft aan niet te verwachten dat de dieren ernstige ziekteverschijnselen ontwikkelen maar geeft wel aan dat bij maximaal 25% van de dieren een HEP zal worden toegepast (10% in bijlage 2). Indien de CCD nog vragen wil stellen stelt het Secretariaat voor de aanvrager te vragen dit verder te onderbouwen.

**5.2 lid1** Enerzijds is HEV 3 een infectie die in groeiende mate voorkomt in Europa, met in Nederland 160-300 gedocumenteerde gevallen per jaar. Het betreft voornamelijk mensen met een verzwakt immuunsysteem. Anderzijds kan een infectie ook voorkomen worden door rauw varkensvlees te vermijden, er is dus als het ware een alternatief. Daarnaast is het niet duidelijk of een mogelijk vaccin voldoende werkzaam zou zijn bij mensen met een verzwakt immuunsysteem of dat varkenshouders hun varkens zouden vaccineren tegen een virus waar de dieren zelf geen last van hebben, om een kleine groep mensen te beschermen. Deze punten maken dat de opbrengsten onzeker zijn. De DEC heeft deze dilemma's ook aangekaart in haar advies, maar heeft wel geadviseerd de aanvraag te vergunnen.

**5.2 lid1**

## **6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

## 5.2 lid1

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.



**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** maandag 13 september 2021 08:52  
**Aan:** 5.1 lid2h  
**CC:** 5.1 lid2e 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202114785  
**Categorieën:** Dossier: 5.1 lid2e

Geachte 5.1 lid2e,

Op 06-04-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Development of a Hepatis E genotype 3 animal model and use in vaccine and treatment" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202114785. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

### Welke informatie nog nodig

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

#### Onduidelijkheden

- U geeft aan dat u het diermodel voor 2 doelen wilt gebruiken: enerzijds het ontwikkelen van humane vaccins voor mensen met een verhoogd risico op HEV 3 besmetting en anderzijds het ontwikkelen van vaccins voor gebruik in varkens teneinde vlees te produceren dat gegarandeerd vrij is van HEV 3. De CCD vindt de eerste doelstelling realistisch maar heeft twijfels bij de tweede. Om infectie bij mensen zoveel mogelijk te voorkomen zou de hele veestapel gevaccineerd moeten worden. De CCD weet niet in hoeverre dit in werkelijkheid ook zou gebeuren. De varkens zelf hebben immers geen last van een infectie en de humane doelgroep is klein. Kunt u toelichten waarom u toch denkt dat dit kans van slagen heeft?
- U geeft in het projectvoorstel getallen weer over het voorkomen van HEV 3 in Europa en Nederland. Kunt u ook iets zeggen over het aantal sterfgevallen, wereldwijd en in Nederland specifiek, gelinkt aan HEV 3?
- Bij de bijlagen, onder A, beschrijft u niet hoe lang de experimenten maximaal duren voor de varkens. Kunt u dit nog aangeven? Dit is voor de CCD nodig om een goede inschatting van het ongerief te kunnen maken.
- Bij de bijlagen, vraag B geeft u niet aan of u varkens van beide geslachten gebruikt of van één geslacht. Kunt u dit nog aanvullen? Bij het gebruik van één geslacht graag ook een onderbouwing geven waarom dit nodig is om de doelstellingen te behalen.
- Kunt u bij de bijlagen, onder vraag D dieper ingaan op vervanging? U geeft aan dat u alternatieven heeft onderzocht en dat deze niet haalbaar waren. Kunt u toevoegen welke alternatieven er beschikbaar zijn en waarom deze niet kunnen bijdragen aan het behalen van de doelstellingen van dit project?
- Bij de bijlagen, vraag D, onder verfijning geeft u een motivering voor de keuze voor het diermodel. Kunt u hier ook ingaan op de translationele waarde naar de mens voor het ontwikkelen van vaccins voor patiënten? En kunt u hier ook ingaan op de onnatuurlijke wijze van infectie?
- Bij de bijlagen, vraag D staat de vraag: "Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment." U gaat hier niet in op de maatregelen die u neemt om het lijden van de dieren zoveel mogelijk te vermijden. Kunt u dit alsnog doen?

- Bij vraag J geeft u algemene humane eindpunten. Kunt u ook humane eindpunten formuleren die specifiek bij deze infectie zouden kunnen passen? U geeft aan dat de dieren maximaal matig ongerief zullen ondergaan, de humane eindpunten moeten zo gekozen zijn dat ernstig ongerief wordt uitgesloten.
- Ook geeft u bij vraag J van de bijlagen aan dat u niet verwacht dat de varkens ernstig ziek worden door de route van infectie. Toch geeft u daaronder aan dat verwacht wordt dat bij 25% een humaan eindpunt zal worden toegepast (10% in bijlage 2). Kunt u verklaren waarom u zo'n hoog percentage opgeeft als u niet verwacht dat de dieren ernstig ziek worden?
- U heeft als beoogde startdatum 01-02-2021 ingevuld, terwijl uw aanvraag pas in april door ons ontvangen is. Wilt u de looptijd van uw aanvraag nog wijzigen? U hoeft ons daarvoor geen nieuw aanvraagformulier te sturen, een antwoord op deze vraag volstaat.

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

### **Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Tijdens de beoordeling van uw aanvraag blijkt dit project complex of multidisciplinair te zijn. Wij hebben daarom meer tijd nodig om uw aanvraag volledig te kunnen beoordelen. U krijgt binnen vijftien werkdagen nadat uw aanvraag compleet is, een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

### **Wanneer een beslissing**

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

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
.....

T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

AAN  
Bureau CCD

VAN  
5.1 lid2e  
20 september 2021

Geachte 5.1 lid2e ,

Bijgevoegd stuur ik de antwoorden op de opgemerkte onduidelijkheden in aanvraag AVD 5.1 lid2h 20214785. In de antwoorden heb ik aangegeven of er wijzigingen in de aanvraag zijn gemaakt. Daarnaast stuur ik de aanvraag met in kleur weergegeven de wijzigingen.

Ik hoop, dat het voldoende helder is,

## Onduidelijkheden

- U geeft aan dat u het diermodel voor 2 doelen wilt gebruiken: enerzijds het ontwikkelen van humane vaccins voor mensen met een verhoogd risico op HEV 3 besmetting en anderzijds het ontwikkelen van vaccins voor gebruik in varkens teneinde vlees te produceren dat gegarandeerd vrij is van HEV 3. De CCD vindt de eerste doelstelling realistisch maar heeft twijfels bij de tweede. Om infectie bij mensen zoveel mogelijk te voorkomen zou de hele veestapel gevaccineerd moeten worden. De CCD weet niet in hoeverre dit in werkelijkheid ook zou gebeuren. De varkens zelf hebben immers geen last van een infectie en de humane doelgroep is klein. Kunt u toelichten waarom u toch denkt dat dit kans van slagen heeft?  
Response: De inschatting dat een HEV vaccin in bepaalde onderdelen van de varkens productieketen is zeker denkbaar. Hierbij is vooral aan top-fokbedrijven te denken, omdat deze dieren voor de vermeerderings- en vleesbedrijven leveren. Deze top-fok bedrijven nemen over het algemeen hun verantwoordelijkheid als het om zoonose vraagstukken gaat. In mijn antwoord naar de DEC had ik al op de inschatting betreffende het nut van vaccins in varkens door een recente publicatie Meester et al. 2021, afkomstig van de veterinaire faculteit UU gewezen. Geen wijziging in tekst

- U geeft in het projectvoorstel getallen weer over het voorkomen van HEV 3 in Europa en Nederland. Kunt u ook iets zeggen over het aantal sterfgevallen, wereldwijd en in Nederland specifiek, gelinkt aan HEV 3?  
Response: Ik heb helaas geen mortaliteitscijfers voor NL kunnen vinden, maar zoals reeds in de antwoord naar de DEC aangegeven worden ca. 50% van de gediagnosticeerde gevallen in het ziekenhuis opgenomen. Omdat het hierbij vaak om immuun-gecompromitteerde patiënten gaat en hepatitis zich chronisch kan manifesteren is HEV niet eenduidig als sterfteoorzaak vastgesteld. Maar in ethische perspectief lijkt mij ok het verlies aan levenskwaliteit en ziektedagen een hoog goed. Geen wijziging in tekst.

- Bij de bijlagen, onder A, beschrijft u niet hoe lang de experimenten maximaal duren

## Memo

# 5.1 lid2h

DATUM  
20 september 2021

ONDERWERP  
AVD 5.1 lid2h 20214785

POSTADRES  
5.1 lid2h

BEZOEKADRES  
5.1 lid2h

INTERNET  
5.1 lid2h

CONTACTPERSOON  
5.1 lid2e

TELEFOON  
5.1 lid2e

E-MAIL  
5.1 lid2e

# 5.1 lid2h

voor de varkens. Kunt u dit nog aangeven? Dit is voor de CCD nodig om een goede inschatting van het ongerief te kunnen maken.

Response: In de eerste paragraaf van beide bijlagen was de volgende informatie verstrekt.

" After inoculation pigs will be followed up to 6 weeks."

" After challenge inoculation with the infectious cDNA clone pigs will be followed up to 6 weeks."

Is dit voldoende? Geen wijziging in tekst.

- Bij de bijlagen, vraag B geeft u niet aan of u varkens van beide geslachten gebruikt of van één geslacht. Kunt u dit nog aanvullen? Bij het gebruik van één geslacht graag ook een onderbouwing geven waarom dit nodig is om de doelstellingen te behalen.

Response: De vraag bij B is naar mijn informatie:

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

Hierop is in de aanvraag antwoord gegeven, er is geen vraag naar sex hierin; voor deze studies kunnen beide geslachten worden gebruikt, maar meestal gebruiken wij mannelijke dieren, omdat de leverancier graag de vrouwelijke dieren voor fokdoeleinden wil gebruiken en het voor onze vraagstelling op dit moment niet relevant is of het beertjes of zeugjes zijn. Gewijzigd.

- Kunt u bij de bijlagen, onder vraag D dieper ingaan op vervanging? U geeft aan dat u alternatieven heeft onderzocht en dat deze niet haalbaar waren. Kunt u toevoegen welke alternatieven er beschikbaar zijn en waarom deze niet kunnen bijdragen aan het behalen van de doelstellingen van dit project?

Response:

Excuses als de indruk is ontstaan, dat er wel een alternatief zou kunnen zijn. Dit is niet het geval, het HEV virus is niet kweekbaar en daarom vallen ook alle in-vitro mogelijkheden weg om directe hepatotoxische/-cellulaire effecten aan te tonen; om inflammatoire leververanderingen en hepatitis te onderzoeken zijn zeker geen alternatieven voor handen. Gewijzigd.

- Bij de bijlagen, vraag D, onder verfijning geeft u een motivering voor de keuze voor het diermodel. Kunt u hier ook ingaan op de translationele waarde naar de mens voor het ontwikkelen van vaccins voor patiënten? En kunt u hier ook ingaan op de onnatuurlijke wijze van infectie?

Response: In het projectvoorstel is een korte vergelijking tussen de beschikbare diermodellen gedaan; de reden waarom het varken als een goed model voor de mens wordt gezien is het feit dat HEV voor deze species natuurlijk besmettelijk is; daarnaast is het varken genetisch en in zijn immunologische reacties zeer vergelijkbaar met de mens. Wij zijn ons bewust van de onnatuurlijke wijze van infectie, achten echter de kans van infectie van levercellen op deze wijze hoger en verwachten daarmee ook een betere mogelijkheid te hebben om immunologische of anti-inflammatoire processen te kunnen bestuderen. Aangepast.

- Bij de bijlagen, vraag D staat de vraag: "Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment." U gaat hier niet in op de maatregelen die u neemt om het lijden van de dieren zoveel mogelijk te vermijden. Kunt u dit alsnog doen?

Response: ik meen mij te herinneren, dat met de CCD is afgesproken, dat deel 1 van deze vraag niet beantwoord hoeft te worden, omdat de antwoorden in onderdelen h,I,J en K ingesloten zijn.

Ik heb nu een antwoord ingevoegd.

DATUM  
20 september 2021

PAGINA  
3 van 4

- Bij vraag J geeft u algemene humane eindpunten. Kunt u ook humane eindpunten formuleren die specifiek bij deze infectie zouden kunnen passen? U geeft aan dat de dieren maximaal matig ongerief zullen ondergaan, de humane eindpunten moeten zo gekozen zijn dat ernstig ongerief wordt uitgesloten.

Response: Nee, normaliter verloopt een HEV infectie in varkens zonder symptomen, maar omdat dit voor ons nieuw is en wij daarnaast genetisch materiaal van HEV virussen gebruiken, die van mensen geïsoleerd zijn, die een hepatitis hebben ontwikkeld is niet uit te sluiten, dat er ziekteverschijnselen zullen ontstaan. Op het moment kunnen wij geen specifiekere HEP's formuleren en zullen vooral volgens goed veterinary practice handelen. Aangepast in tekst

- Ook geeft u bij vraag J van de bijlagen aan dat u niet verwacht dat de varkens ernstig ziek worden door de route van infectie. Toch geeft u daaronder aan dat verwacht wordt dat bij 25% een humaan eindpunt zal worden toegepast (10% in bijlage 2). Kunt u verklaren waarom u zo'n hoog percentage opgeeft als u niet verwacht dat de dieren ernstig ziek worden? Niet gewijzigd.

Response: Deze aannname heeft te maken met een klein aantal dieren in een groep; als er 2 van 8 dieren klinische verschijnselen zouden tonen, die bij een HEP passen zijn dit al 25%; maar zoals aangegeven hebben wij geen onderbouwing hiervoor. Ik wil het daarom toch laten staan.

- U heeft als beoogde startdatum 01-02-2021 ingevuld, terwijl uw aanvraag pas in april door ons ontvangen is. Wilt u de looptijd van uw aanvraag nog wijzigen? U hoeft ons daarvoor geen nieuw aanvraagformulier te sturen, een antwoord op deze vraag volstaat.

Response: gewijzigd.

**Form**

**Project proposal**• This form should be used to write the project proposal of animal procedures.

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

**1 General information**

|     |  |   |
|-----|--|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 5.1 lid2h   |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment.  | 5.1 lid2h   |
| 1.3 | Provide the title of the project.  | Development of a Hepatis E genotype 3 animal model and use in vaccine and treatment studies in pigs |

**2 Categories**

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

**3 General description of the project**

### 3.1 Background

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

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

Hepatitis E virus (HEV) is an important cause of outbreaks and sporadic cases of viral hepatitis in humans in many developing tropical and subtropical countries. HEV infections in humans can vary from asymptomatic or mild disease with fever and nausea to acute hepatitis with symptoms indistinguishable from other types of acute viral hepatitis. HEV is the most important cause of clinical hepatitis in adults throughout Asia and in some European countries. It is estimated that two billion people have been infected with HEV with 14 million symptomatic cases and 300,000 deaths occurring annually around the world [1, 2] [3, 4]. The disease resulting from HEV infection occurs often in pregnant women and is characterized by moderately severe hepatitis that is self-limiting in most patients. However, in immune-compromised individuals, HEV can persist and cause chronic liver disease.

HEV is a positive-stranded RNA virus, which is the sole member of the genus *Hepevirus* in the family of *Hepeviridae*. HEV is a small, round non-enveloped particle of 27-34 nm with a genome approximately 7.2 kb in length. Based on the extensive genomic variability among HEV isolates, HEV sequences have been classified in four major genotypes (1, 2, 3 and 4), all belonging to a single serotype. The different HEV genotypes show a distinct geographical distribution. Genotypes 1 and 2 (HEV 1 and HEV 2) are restricted to humans and are prevalent in developing countries. Genotypes 3 and 4 (HEV 3 and HEV 4) are distributed worldwide, have a much wider host range and are considered to be zoonotic. Clinical cases of HEV in industrialized countries are increasingly caused by zoonotic genotypes HEV 3 and HEV 4 [5]. A recent EFSA report from 2017 [5] describes the recent situation of HEV infections in Europe and states, that "... the reported HEV clinical cases increased from 514 in 2005 to 5617 cases in 2015 with overall more than 21.000 cases reported in 22 EU countries between 2005 and 2017" and that "...more than 95% of the human infections were autochthonous, locally acquired (within the country of residence) due to infection with HEV-3 viruses". About 50% of the cases are hospitalized. According to RIVM information, in the Netherlands there were 160 to 300 cases per year from 2016 to 2020.

Many swine HEV isolates have been identified in both developing and industrialized countries. HEV 3 occurs worldwide, whereas HEV 4 is mainly seen in Asia. Although direct evidence of HEV transmission from humans to animals is lacking, both human and swine genotype 3 strains were experimentally demonstrated to infect pigs and there is a high level of genetic relatedness between HEV isolates obtained from humans and swine [6, 7]. In pigs, HEV infection occurs through the fecal-oral route and the virus first replicates in the gastrointestinal tract and subsequently spread systemically to the liver [8]. After replication in the liver, swine HEV is released to the gallbladder from hepatocytes and is then excreted in feces. Replicative negative-strand HEV RNA was detected in the liver, intestines and lymph nodes of experimentally infected pigs and viral RNA was detected in hepatocytes. There were no remarkable gross lesions and also in natural conditions pigs do not develop any signs of disease. The microscopic pictures were characterized by mild-to-moderate multi-focal lymphoplasmacytic hepatitis and mild focal hepatocellular necrosis [8].

Despite a growing awareness, hepatitis E virus (HEV) remains understudied and investigations have been historically hampered by the absence of efficient cell culture systems to obtain virus isolates, which can be used more standardized in animal studies. Due to this limitation, experimental infections are using infectious tissue or excretion materials from infected animals, which also limits comparative studies between virus strains. As a result, the pathogenesis of HEV infection and basic steps of the HEV life cycle are poorly understood. Major efforts have recently been made through the development of HEV infectious cDNA clones and cellular systems that significantly advanced HEV research [9]. The use of reverse genetic systems has demonstrated the generation of infectious virus from cloned cDNA by transfection of cultured cells and also in animal models. In pigs, the intrahepatic administered infectious clone of a human HEV 4 isolate resulted in a successful infection with subsequent RNA detection of HEV in the period after challenge [10].



Several animal species are susceptible to infection by human HEV strains and are used in animal studies. Based on transmission studies, rhesus monkeys and cynomolgus monkeys are considered the most suitable models for HEV studies [4]. However, despite production of efficient virus replication, nonhuman primate have limitations in reproducing the clinical and pathological aspects of hepatitis. Furthermore, limited animal resources, cost, and ethical considerations have limited the widespread use of nonhuman primate models in HEV research today. HEV can naturally infect pigs and therefore pigs are considered as one of the primary animal models for HEV infections in biomedical studies and are at the same time useful in target animal studies.

Also for humans, who are at risk, vaccination might be a critical tool to prevent infection. So far only one, in China registered HEV vaccine is available. This is a subunit vaccine based on the capsid protein of HEV 1 [11, 12]. In the veterinary field vaccination is considered a potentially successful approach to reduce the incidence of HEV in the pig population and reduce the zoonotic risk [12-14]. After natural infection, humans and also pigs develop HEV specific antibodies and also after vaccination with the Chinese vaccine antibodies are elicited and efficacy has been shown against HEV 4. The current vaccine effectively protects against symptomatic HEV 4 infection, however, protection is dependent on the height of the IgG titre and the duration of immunity post vaccination is limited [15]. Efficacy of the vaccine against HEV 3 is unknown. Thus new vaccines with a high and long-lasting efficacy against in Europe predominant HEV 3 infections are needed.

Current therapeutic options against HEV are limited to one unspecific antiviral, Ribavirin and cytokine treatments. Treatment with Ribavirin is off -label use and in only a limited number of patients successful. Therefore, therapeutic tools or HEV-specific antivirals to treat infections are missing and an animal model can be essential for ultimate testing the efficacy of the urgent needed new drugs in HEV 3 therapy.

In conclusion, a readily available animal model to study the underlying mechanism of acute hepatitis after HEV 3 infection is still lacking. With such a reproducible model of HEV new vaccine candidates for humans and pigs will be tested, and also used for evaluating the efficacy of antivirals and therapeutics against HEV infections in humans.

### 3.2 Purpose

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

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

- To establish an animal model in pigs for HEV infections using infectious copies from HEV strains
- to evaluate vaccines for humans and pigs (to be used in the current research project and in CRO projects)
- to evaluate antivirals and therapeutics against HEV infection (to be used in CRO projects)

These direct objectives will contribute to the development of strategies for the prevention and treatment of HEV3 infections in humans and to reduce the zoonotic risk by transmission from pigs to humans.

#### 3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

The approach to achieve the goal by using infectious clones to introduce a HEV infection in pigs has already been shown earlier with HEV 4 [10]. Therefore it is highly likely that the infection model for HEV 3 will work, especially as the international project collaborators have a strong experience of producing infectious cDNA clones from positive stranded RNA viruses and have already a HEV 3 clone derived from a severe, human case prepared. The virulence of this human isolate derived clone needs to be proven in the pig model. The international partner, but also our institute have long standing expertise with infections in pigs and also with all facets of research and diagnostics of HEV 3 infections in pigs.

Project partners are developing subunit vaccines against HEV 3 based on a vector-vaccine concept and immunogenicity and efficacy studies will be performed with such vaccines. The current rapid developments of nucleic acid based vaccines like mRNA vaccines make it very likely that research groups will address us in the case a successful model can be provided.

3.2.3 andere wetgeving  
X nee

### **3.3 Relevance**

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

---

#### 3.3.1

Even though some in vivo or in vitro models have been established for HEV there is a need for an animal experimental model that can reliably reproduce human disease using controlled exposure. There is no treatment available to control acute HEV, although monotherapy with ribavirin seems to elicit an efficient response in chronic HEV patients infected during organ transplantation. There are currently (outside China) no vaccines approved to control HEV, albeit some have been tested in clinical trials but their safety and efficacy needs further studies. Therefore, there is an unmet need for the identification of efficient vaccine candidates to HEV.

The research will contribute to the one-health approach to control HEV in pigs in order to minimize the proportion of pigs carrying HEV at the time of slaughter as requested in a recent EFSA biohazard report [[16].

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is

Stakeholders in this project are:

- patients suffering from acute or chronic infection with HEV3 and who need early therapeutic means like antivirals to reduce virus load
- immune compromised persons, who could benefit from preventive vaccines, which can only be developed when a reliable animal model is available
- the pig producing sector which needs for a responsible one-health approach means to prevent transmission to humans by for example vaccination.
- the pig as target species might benefit from vaccination as the role of subclinical HEV infections for other diseases is still unclear.
- the research organisation, which makes use of the animal model within current research projects, but also by making the animal model available for collaborations with and services for other academic and private partners

### **3.4 Research Strategy**

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

---

Swine are attractive animal models for human infectious diseases due to e.g. similarities in anatomy, physiology and size, availability of samples, and the similarity of the pig immune system to the human counterpart. With the continuous development of porcine immunological reagents to characterize both antigen presenting cells and lymphocytes, including tracking of virus specific T cell responses, meaningful mechanistic models for interpretation of experimental data are available to provide surrogate immunological endpoints that predict human in vivo outcomes.

Genotype 3 of HEV (HEV 3) is a pig virus, and it is expected, that the human infection can readily be compared in this model. Current virus isolates are of low virulence in pigs and therefore a model will be established by evaluating the virulence of infectious clones isolate from a severe disease human patient. The international project group has extensive experience in generating in vivo infectious cDNA clones of difficult-to-culture positive strand RNA viruses, and in adapting them to high titer growth in modified cultures. These models will be used for evaluations of promising new vaccines and therapeutics.

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

---

The lack of reproducible and reliable production of infectious virus in cell-culture systems has hampered the development of animal models for HEV 3. A recent study has shown that infectious clones of HEV 4 can infect pigs and result in virus proliferation and serological response [10] and a similar strategy will be followed in this project for HEV 3.

International collaborators, contributing to this project, have developed techniques to establish infectious clones of HEV viruses of various field isolates from severe HEV 3 infections in humans. These infectious clones will be used to establish the animal model after intrahepatic administration followed by challenge dose validation studies. Young pigs will be inoculated with the respective infectious clone either intravenously or by intrahepatic injection (under anaesthesia and with ultrasound guidance). The pigs will be followed for a period of three weeks and clinical signs, virus excretion and immunological and clinical-pathological measurements performed and thereafter extensive pathological examination.

If the model development results in a suitable animal model, in which typical clinical signs and morphological signs of hepatitis are expressed and reproduction and excretion of infectious virus can be measured, the established animal model will be used to study the immunogenicity and protection of two different subunit vaccines for use in humans and will also be made available to be used by other vaccine developers for the development of human and pig HEV 3 vaccines.

Vaccination studies will be performed in young pigs with vaccine constructs, which have shown immunogenicity either in pigs or other species. These studies will comprise two or three vaccinations in an interval of 2 to 4 weeks followed by a challenge infection and an post-challenge observation period of up to 6 weeks. Serological analysis of blood samples taken before and after vaccination and analysis of T-cell responses will be performed to assess the pre-challenge immune reaction and in the post-challenge period, and viremia and virus excretion after challenge infection as well as clinical-pathological and pathological examinations will be performed. To study vaccine efficacy under natural transmission conditions, protection after vaccination will also be tested in contact studies, where pigs will be infected with an infectious clone and co-housed with naive pigs. Here, especially virus propagation in gastro-intestinal tissue and liver and virus excretion will be studied and the efficacy of vaccines to protect against infection via the natural oro-faecal route will be examined.

The evaluation of new therapeutic approaches like antivirals are not part of our own research project, but the developed animal model will be made available to other research groups for pre-clinical testing of new candidates. For the evaluation of antivirals or therapeutics in vivo studies results of preceding in-vitro investigations will be requested and only successful in-vitro candidates will be tested in the pig model. Young pigs will be infected with the infectious clone and the antiviral efficacy will be tested by studying the reduction of signs of hepatitis like the reduced increase of liver enzymes and/or gene expression profiles in blood or liver tissue and the reduction in viremia, virus excretion and virus load in liver tissue and intestinal tract.

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

---

The development of the animal model with infectious clones of HEV 3 resulting in : viremia, faecal virus excretion and signs of hepatitis in clinical -chemistry (increase in liver enzymes AST, ALAT and  $\gamma$ GT) as well as liver pathology with manifestation of hepatitis will be the objective of the first step and is covered by animal procedure 3.4.4.1 (milestone 1: aforementioned criteria achieved -->go/otherwise no go for following studies).

Following studies (animal procedure 3.4.4.2.) to examine vaccine efficacy in experimentally and naturally (through transmission) infected animals or therapeutic approaches are dependent on the well characterized and reproducible animal model. Currently in our research project two vaccine studies are planned.

The model will be offered as contract research activity to academic and private partners for vaccine development and also to study efficacy of antiviral treatments. Here we expect to perform two

vaccine studies and two treatment studies in the project period. Therapy candidates and antivirals will only (go/no go) be tested a) if they have been shown to induce in-vitro viricidal activity (selection point) against HEV.

## References

1. Emerson, S.U. and R.H. Purcell, *Hepatitis E virus*. Rev Med Virol, 2003. **13**(3): p. 145-54.
2. Legrand-Abravanel, F., et al., *Hepatitis E virus genotype 3 diversity, France*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(1): p. 110-4.
3. Van der Poel, W.H.M., et al., *Knowledge gaps and research priorities in the prevention and control of hepatitis E virus infection*. Transbound Emerg Dis, 2018. **65 Suppl 1**: p. 22-29.
4. Kenney, S.P. and X.J. Meng, *Hepatitis E Virus: Animal Models and Zoonosis*. Annu Rev Anim Biosci, 2019. **7**: p. 427-448.
5. Meester, M., et al., *Infection dynamics and persistence of hepatitis E virus on pig farms - a review*. Porcine Health Manag, 2021. **7**(1): p. 16.
6. Feagins, A.R., et al., *Cross-species infection of specific-pathogen-free pigs by a genotype 4 strain of human hepatitis E virus*. J Med Virol, 2008. **80**(8): p. 1379-86.
7. Hazards, E.P.o.B., et al., *Public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen*. EFSA J, 2017. **15**(7): p. e04886.
8. Bouwknegt, M., et al., *The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation*. BMC Vet Res, 2009. **5**: p. 7.
9. Scholz, J., et al., *Reverse genetics approaches for hepatitis E virus and related viruses*. Curr Opin Virol, 2020. **44**: p. 121-128.
10. Cordoba, L., et al., *Rescue of a genotype 4 human hepatitis E virus from cloned cDNA and characterization of intergenotypic chimeric viruses in cultured human liver cells and in pigs*. J Gen Virol, 2012. **93**(Pt 10): p. 2183-2194.
11. Zhang, J., et al., *Long-term efficacy of a hepatitis E vaccine*. N Engl J Med, 2015. **372**(10): p. 914-22.
12. *Hepatitis E vaccine: WHO position paper, May 2015*. Wkly Epidemiol Rec, 2015. **90**(18): p. 185-200.
13. Wang, B. and X.J. Meng, *Hepatitis E virus: host tropism and zoonotic infection*. Curr Opin Microbiol, 2021. **59**: p. 8-15.
14. Opriessnig, T., et al., *Future perspectives on swine viral vaccines: where are we headed?* Porcine Health Manag, 2021. **7**(1): p. 1.
15. Kinast, V., et al., *Hepatitis E Virus Drug Development*. Viruses, 2019. **11**(6).
16. EFSA, *Public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen*. EFSA Journal, 2017. **15**(7): p. 4886.

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

| Serial number | Type of animal procedure              |
|---------------|---------------------------------------|
| 1             | Development of a HEV E disease model  |
| 2             | HEV vaccination and treatment studies |

Appendix  
Description animal procedures

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

### 1 General information

| 1.1           | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.                                  | 5.1 lid2h   |               |                          |   |                                      |  |
|---------------|---|---|---------------|--------------------------|---|--------------------------------------|--|
| 1.2           | Provide the name of the licenced establishment.   | 5.1 lid2h   |               |                          |   |                                      |  |
| 1.3           | List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | <table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="438 1008 933 1064">Serial number</th> <th data-bbox="933 1008 1423 1064">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="438 1064 933 1283">1</td> <td data-bbox="933 1064 1423 1283">Development of a HEV E disease model</td> </tr> </tbody> </table> | Serial number | Type of animal procedure | 1 | Development of a HEV E disease model |  |
| Serial number | Type of animal procedure  |   |               |                          |   |                                      |  |
| 1             | Development of a HEV E disease model  |   |               |                          |   |                                      |  |

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

This procedure will be used to establish the animal model for HEV3 infections in pigs by performing a proof of concept study, a dose refinement study and further studies to characterize the model in more detail by pathogenesis and immunological studies in the course of the HEV3 infection. To establish the infection model 4 to 10 week old pigs will be inoculated with infectious cDNA copies of the virus by various inoculation routes, i.e. either intravenous or into the liver tissue (intrahepatic) under visual control. At least for the latter procedure, pigs are anaesthetized by injection and inocula will be administered under ultra sound control. After inoculation pigs will be followed up to 6 weeks. After inoculation pigs will be examined clinically by visual examination and rectal temperature control daily (or twice daily) and viremia, white blood cell analysis (automated counting, FACS), clinical chemistry with specific focus on liver enzymes and also immune and inflammation related serum parameters will be examined. At the end of the observation period all pigs will be euthanized and undergo pathological examination and tissue will be collected for (immune)histological and virological examination. Primary outcomes of the study are viremia, virus excretion and signs of hepatitis, i.e. increased liver enzymes, systemic inflammation and signs of acute or chronic hepatitis (confirmed by histology). The established model will be further characterized in pathogenesis studies and by studying transmission to naive contact pigs to be able to study effects on the natural infection mode.

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

Inoculation of infectious materials and control materials:

- Intravenous inoculation: infectious materials will be administered once in max. 4 ml volume via ear vein catheter or via needle injection into the jugular vein; for the inoculation pigs can be anaesthetized if this is considered necessary to compare the i.v. administration route with the intrahepatic administration.
- Intrahepatic inoculation: infectious materials will be administered in anaesthetized pigs using an ultrasound-guided technique on four different sites of the liver with a maximal volume of 250 µl per site; anaesthesia will be performed by use of injection anaesthesia;

Sampling:

- Blood samples (heparin/EDTA/serum blood) will be collected before inoculation and after inoculation with a maximal volume of 10% of the circulating volume in a period of 4 weeks; after inoculation blood samples will be taken 2 to 4 times per week; for blood sampling pigs will be restrained.
- Faecal samples will be obtained during rectal temperature measurements about two times per week;

Clinical observation:

- After inoculation pigs will be examined twice daily by visual observation and findings recorded, observations will be increased as soon as severe clinical signs occur; note: HEV usually does not induce clinical symptoms, but the choice to use infectious copies of a human isolate from severely ill patient is expected to result in clinical disease signs, like reduced activity, reduced appetite, fever, abdominal pain due to liver swelling, but the degree of severity is not predictable.
- Rectal temperature will be taken once, and around inoculation twice daily without restraining
- Body weight will be determined weekly.

Necropsies: pigs will be euthanized and tissues obtained for virological and pathological examinations.

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

No statistical methods have been applied for the studies to establish the model, because we do not have experience with this model yet; there is only one study using three pigs per group to show infectivity of the infectious copy. Here we will start with a feasibility study with groups of six pigs to establish the model and as soon as there is sufficient evidence and information of the standard deviation in regard to the key parameters, the number of animals will be calculated based on these data for a following challenge dose defining study. The model to be used in vaccination or treatment studies should be statistical meaningful with maximally 10 animals per group. This is considered a critical point in the acceptance of the model

## **B. The animals**

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

Species: pigs; the pig is susceptible to infections with HEV (although without expressing clinical signs, but mild pathological changes in the liver) and due to similarities to the human immune system accepted as animal model;

Origin: SPF pig farm; pigs should be free of relevant porcine pathogens and serological negative for HEV

Life stage: 4 to 10 weeks of age; in field conditions pigs of this age are considered to be susceptible

Numbers: 64 pigs; for the first two studies (feasibility of animal model, challenge dose refinement study) four groups with 6 to 8 pigs per group are used and for later studies (pathogenesis/ model characterization) the numbers per group might be increased to 10 pigs per group, we expect to perform two studies with four groups per study. The exact number of animals will be calculated based on the data of the first studies and justified in the respective experimental plan and discussed with the IvD

Gender: in these studies male as well as female animals can be used; however, due to the fact that the supplier prefers to supply male animals and use the females for breeding purposes and the fact that the sex of the animals most likely does not influence the outcome of the study, we will most of the times use boars

## **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

## **D. Replacement, reduction, refinement**

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

Replacement: The use of in-vitro or other animal-free experimental methods to achieve a model to study the complexity of HEV infections, which enables to study pathogenesis and vaccine efficacy was examined, but due to the fact that the virus is not culturable and therefore hepatocellular effects can not directly be addressed and also inflammatory reactions cannot be evaluated, no alternatives exist.

Reduction: A literature research on animal models for studies on HEV infection was performed in PubMed and Scopus and revealed that an approach as used here, has been used for HEV 4; In the exploratory phase, the number of animals to be used is reduced to the minimum, which provides sufficient information in regard to virus proliferation and host response to the infection. The results of this exploratory phase will determine the numbers of animals for the consecutive studies to be able to achieve meaningful results. The decision of the number of animals and the reasons for this decisions will be discussed in the respective experimental plan and with the IvD.

Refinement: A few animal models for HEV are described in various species, e.g. in non-human primates, rabbits, mouse, rats, and pigs. We chose to develop the animal model in the pig species, because the species is susceptible for (asymptomatic) infection, thus a natural host, and can be used for biomedical research as well as for target animal research (veterinary vaccines). The analytical tool box for pigs like tools for immunological investigations or gene expression studies in infected tissues are well developed in this species. Additionally there is a high genetic relationship between pig and human, which increases the likeliness of comparable immunological and liverspecific reactions. Although the infection route is not the natural infection route, i.e. intestine and with the portal flow to the liver, we consider this infection route as a higher chance to induce a hepatitis, which enables to study immunological and inflammatory changes and assess vaccination efficacy and treatment efficacy.

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

To minimize animal suffering, pain or fear the following measure are taken: animals will be treated under anesthesia when necessary (see below) and animals are kept in a group with environmental enrichment materials and will be observed at least twice daily by experienced animal caretakers and all manipulations will be performed by experienced care takers.

No adverse effects on the environment are expected and all studies with infectious cDNA clones will be performed in DM-III conditions as stated in the GMO permission GGO IG 20-076.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

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

n/a

## Accommodation and care



## F. Accommodation and care

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

No

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

Pigs will be kept in pens HEPA filtered pens with straw covered solid floors, pen environment is enriched with changing playing materials

## G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Pigs will be kept under anaesthesia during the intra-hepatic inoculation procedure to ensure correct administration of the inoculum. The inoculation is considered to induce similar or less pain as a liver biopsy does; in humans taking of liver biopsies is considered to induce mild pain and there usually no pain relieve methods are applied; in analogy, it is planned not to apply additional pain relieving methods after injection unless inoculation related distress is displayed.

### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

- handling of the animals
- the invasive technique due to the intrahepatic administration
- Single intravenous administration
- effects due to symptomatic infection.
- Repeated blood sampling

Explain why these effects may emerge.

Handling of the animals will result in stress. The intrahepatic injection will be done under anaesthesia and ultrasound control, the invasive technique and the intrahepatic administration with low volumes are expected not to induce pain in the period after anaesthesia.

Single intravenous administration of inoculum is not expected to cause more pain as the injection pain itself, combined with the stress of restrain.

If hepatitis due to the infection occurs, the expected clinical signs are reduced activity, reduced appetite and weight loss, currently more clinical symptoms are not expected.

Repeated blood sampling will induce some stress as repeated restrain during blood sampling will cause stress.

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

Injection anaesthesia will be used for the intrahepatic injection, all other procedures will be performed in the conscious animal by experienced personnel. To minimize stress the animals will be adapted to handling in the acclimatization period.

## J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

The intention of the procedure is to induce an infection, which leads to hepatitis. Acute severe hepatitis can result in pain due to liver swelling and liver inflammation. Pigs are known to be susceptible to HEV infections, but usually manifest only mild signs of hepatitis without any clinical disease signs; we expect that the induced hepatitis will result in signs of hepatitis confirmed by clinical chemistry and pathology, but do not expect severe clinical disease. As, currently we can only speculate on the severity of disease, the following humane endpoints are defined:

- Recumbent at two successive observation moments within 12 hours
- No feed intake for 24 hours
- Weight loss compared to inoculation time point of more than 15% (corrected for age dependent growth curve)
- criteria according good veterinary practice

HEP's will be adapted and discussed with IvD, based on the growing experiences in the project.

Indicate the likely incidence.

25% (estimation without evidence)

## K. Classification of severity of procedures

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

Intravenous Inoculation: mild  
Intraheaptic inocuation: moderate  
Due to disease: moderate  
Repeated blood sampling; moderate

Overall: moderate

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Animal will be euthanized and during gross pathology examination appropriate tissues will be collected for further analysis, i. e. at least virology and pathology examinations.

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

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

Yes

Appendix  
Description animal procedures

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

**1 General information**

|  |                            |   |
|--|----------------------------|---|
| <p>1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.</p>                                  | <p>5.1 lid2h</p>           |   |
| <p>1.2 Provide the name of the licenced establishment.</p>   | <p>5.1 lid2h</p>           |   |
| <p>1.3 List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</p> | <p>Serial number<br/>2</p> | <p>Type of animal procedure<br/>HEV vaccination and treatment studies</p> |

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In this procedure the established animal model for HEV3 infections in pigs is used to evaluate vaccine candidates for human vaccines and for new pig vaccines in target animal studies and to evaluate antivirals and drugs in biomedical studies.

Four to ten week old pigs will be vaccinated once or repeatedly (max. 3 times) in two to four week intervals depending on the vaccine type and at two to six weeks after the last vaccination the pigs will be inoculated with infectious cDNA copies of the virus by the inoculation routes, which was selected from the animal model studies, i.e. either intravenous or into the liver tissue. After vaccination pigs are examined for the occurrence of side effects and the development of immune responses (serological, T-cell responses);

For biomedical studies, i.e. studies to investigate the efficacy of anti-virals/therapeutics in the acute infection phase four to ten week old pigs will be treated with the investigational product, which is either administered once or repeatedly parenteral or by oral administration; only products will be tested which have been shown to be safe in safety studies [note: biomedical studies are not part of the research project, but expected to be requested on the basis of CRO activities or other academic cooperations].

After challenge inoculation with the infectious cDNA clone pigs will be followed up to 6 weeks. In vaccine studies additional non-vaccinated control groups may be used, by which the protection against natural transmission will be studied.

After inoculation pigs will be examined clinically by visual examination and rectal temperature control daily (or twice daily) and viremia, white blood cell analysis (automated counting, FACS), clinical chemistry with specific focus on liver enzymes and also immune and inflammation related serum parameters will be examined

At the end of the observation period all pigs will be euthanized and undergo pathological examination and tissue will be collected for (immune)histological and virological examination. Primary outcomes of the study are reduction in viremia and virus excretion and reduction in signs of hepatitis, i.e. change in liver enzyme content in blood, systemic inflammation and signs of acute or chronic hepatitis (confirmed by histology).

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

Treatment:

- Vaccination will be done one to three times and depending on the vaccine candidate this can be done by various routes, i.e. intramuscular (max. 2 ml/site), subcutaneous (max. 2 ml/site); intradermal (100 µl/site) or by mucosal vaccination (intranasal/oral).
- antivirals or drugs for treatment, which will be evaluated will be administered orally (once or by daily gavage) or by injection ones or maximum of three times;

Inoculation of infectious materials and control materials:

- Intravenous inoculation: infectious materials will be administered in max. 4 ml volume via ear vein catheter or via needle injection into the jugular vein; for the inoculation pigs can be anaesthetized if this is considered necessary to compare the i.v. administration route with the intrahepatic administration.

- Intrahepatic inoculation: infectious materials will be administered in anaesthetized pigs using an ultrasound-guided technique on four different sites of the liver with a maximal volume of 250 µl per site; anaesthesia will be performed by use of injection anaesthesia;

Sampling:

- Blood samples (heparin/EDTA/serum blood) will be collected from the jugular vein before inoculation and after inoculation with a maximal volume of 10% of the circulating volume in a period of 4 weeks; after inoculation blood samples will be taken 2 to 4 times per week; for blood sampling pigs will be restrained.

- Faecal samples will be obtained during rectal temperature measurements about two times per week;

Clinical observation:

- After inoculation pigs will be examined twice daily by visual observation and findings recorded, observations will be increased as soon as severe clinical signs occur; note: HEV usually does not induce clinical symptoms, but the choice to use infectious copies of a human isolate from severely ill patient is expected to result in clinical disease signs, like reduced activity, reduced appetite, fever, abdominal pain due to liver swelling, but the degree of severity is not predictable.

- Rectal temperature will be taken once, and around inoculation twice daily without restraining

- Body weight will be determined weekly.

Necropsies: pigs will be euthanized and tissues obtained for virological and pathological examinations.

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

No statistical methods have been applied for these studies and the numbers of animals per group depend on the established model, because we do not have experience with this model yet; based on the information from the model development studies on means and standard deviation of key parameters such as virus excretion, virus load, change in biochemical data or pathology data, the number of animals will be calculated based on these data. Key parameters can differ between the objectives of the vaccination or treatment studies and the effect size, (incl. power and probability) will be defined before. Based on the figures of the model development studies, it will be decided whether the objective is achievable. However, the model to be used should be statistically meaningful in vaccination and biomedical studies with maximally 10 animals per group. This is considered a critical point in the acceptance of the model. The exact numbers will be calculated based on the data of the established animal model and justified in the respective experimental plan and discussed with the IvD.

## **B. The animals**

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

Species: pigs; the pig is susceptible to infections with HEV (although without expressing clinical signs, but mild pathological changes in the liver) and due to similarities to the human immune system accepted as animal model;

Origin: SPF pig farm; pigs should be free of relevant porcine pathogens and serological negative for HEV

Estimated number: 240; It is expected that the availability of the animal model will stimulate requests from vaccine developers to investigate the immunogenicity and efficacy of new developed vaccine candidates; therefore we assume to perform 4 studies with about six treatment groups and a maximum number of 10 pigs per group

Life stage: 4 to 10 weeks of age; in field conditions pigs of this age are considered to be susceptible

## **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

### C. Re-use

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: The use of in-vitro or other animal-free experimental methods to achieve information on the immunogenicity of vaccines and the efficacy of vaccines or antivirals/drugs in the complexity of a HEV infections was evaluated, but considered to be not feasible and also not informative.

Reduction: A literature research on animal models for studies on HEV infection and vaccination was performed in PubMed and Scopus and used for the development of the animal model.

The results of this development phase determines the numbers of animals for the consecutive studies to be able to achieve meaningful results. The decision of the number of animals and the reasons for this decisions will be discussed in the respective experimental plan and with the IvD.

Refinement: A few animal models for HEV are described in various species, e.g. in non-human primates, rabbits, mouse, rats, and pigs. We chose to develop and use the animal model in the pig species, because the species is susceptible for (asymptomatic) infection, thus a natural host, and can be used for biomedical research as well as for target animal research (veterinary vaccines). The analytical tool box for pigs like tools for immunological investigations or gene expression studies in infected tissues are well developed in this species.

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

No adverse effects on the environment are expected and all studies with infectious cDNA clones will be performed in DM-III conditions as stated in the GMO permission GGO IG 20-076.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

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

n/a

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

Pigs will be kept in HEPA filtered pens with straw covered solid floors, pen environment is enriched with changing playing materials

### G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Pigs will be kept under anaesthesia during the intra-hepatic inoculation procedure to ensure correct administration of the inoculum. The inoculation is considered to induce similar or less pain as a liver biopsy does; in humans taking of liver biopsies is considered to induce mild pain and there usually no pain relieve methods are applied; in analogy, it is planned not to apply additional pain relieving methods after injection unless inoculation related distress is displayed.

### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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



## I. Other aspects compromising the welfare of the animals

- handling of the animals
- the invasive technique due to the intrahepatic administration
- Single intravenous administration
- effects due to symptomatic infection.
- Repeated blood sampling

Explain why these effects may emerge.

Handling of the animals will result in stress.

Vaccination can result in local site reactions, which can result in short lasting increase of body temperature or local swellings and in very exceptional situation to allergic shock like reactions. It will also lead to restrain stress during the vaccination procedure.

The intrahepatic injection for the injection of challenge materials will be done under anaesthesia and ultrasound control, this invasive technique and the intrahepatic administration with low volumes are expected not to induce pain in the period after anaesthesia.

Single intravenous administration of inoculum is not expected to cause more pain as the injection pain itself, combined with the stress of restrain.

If hepatitis due to the infection occurs, the expected clinical signs are reduced activity, reduced appetite and weight loss, currently more clinical symptoms are not expected.

Repeated blood sampling will induce some stress as repeated restrain during blood sampling will cause stress

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

To minimize stress the animals will be adapted to handling in the acclimatization period.

During the vaccination phase animals will be observed directly after vaccination (30 minutes) and if adverse, shock like reactions occur appropriately treated, additionally body temperatures and local site reactions will be observed and recorded and treated if necessary.

Injection anaesthesia will be used for the intrahepatic injection, if used, all other procedures will be performed in the conscious animal by experienced personnel.

## J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

The intention of the procedure is to induce an infection, which leads to hepatitis. Acute severe hepatitis can result in pain due to liver swelling and liver inflammation. Pigs are known to be susceptible to HEV infections, but usually manifest only mild signs of hepatitis without any clinical disease signs; we expect that the induced hepatitis will result in signs of hepatitis confirmed by clinical chemistry and pathology, but do not expect severe clinical disease. As, currently we can only speculate on the severity of disease, the following humane endpoints are defined:

- Recumbent at two successive observation moments within 12 hours
- No feed intake for 24 hours
- Weight loss compared to inoculation time point of more than 15% (corrected for age dependent growth curve)

HEP's will be adapted and discussed with IvD, based on the growing experiences in the project.

Indicate the likely incidence.

10% (estimation without evidence as currently no figures are available; we also take in account that vaccination/treatment is to a certain degree effective)

#### **K. Classification of severity of procedures**

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

Repeated Vaccination i.m. or intradermal: mild  
Intravenous Inoculation: mild  
Intraheaptic inocuation: moderate  
Due to disease: moderate  
Repeated blood sampling; moderate

Overall: moderate

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Animal will be euthanized and during gross pathology examination appropriate tissues will be collected for further analysis, i. e. at least virology and pathology examinations.

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

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

Yes

|  |   |
|--|---|
| Naam van het project   | Ontwikkeling van een hepatitis E genotype 3 diermodel voor vaccinatie en interventiestudies in varkens  |
| NTS-identificatiecode  | NTS-NL-981439 v.1   |
| Nationale identificatiecode van de NTS<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i> |   |
| Land   | Nederland   |
| Taal   | nl  |
| Indiening bij EU<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>                       | ja  |
| Duur van het project, uitgedrukt in maanden.                                   | 60  |
| Trefwoorden  | Hepatitis<br>vaccins<br>antivirale middelen<br>HEV<br>varken  |
| Doel(en) van het project   | Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Besmettelijke ziekten van de mens<br>Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Ziekten en aandoeningen van dieren |

#### DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

|   |  |
|---|--|
| Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).  | Hepatitis E virus veroorzaakt acute en chronische leverontsteking (Hepatitis E) met jaarlijks meerdere miljoenen infecties en ca. 300.000 doden wereldwijd. De meeste infecties komen voor in Azië, maar ook in Europa worden regelmatig gevallen gezien vooral bij patiënten met een verzwakt immuun systeem. Het virus komt voor in vier verschillende genotypen, waarbij de genotype 1 en 2 de meest belangrijke oorzaak van hepatitis E zijn en voornamelijk in Aziatische landen voorkomen. Het in Europa voorkomende genotype 3 (HEV 3) wordt ook als een veroorzaker van hepatitis in de mens gezien. HEV 3 komt veelvuldig in varkens voor en zowel de dieren als ook producten van varkens kunnen een risico voor overdracht naar de mens vormen. Omdat het varken ook een natuurlijk gastheer van HEV is, kan het een geschikt diermodel zijn. Een dergelijk diermodel is belangrijk voor vaccinonderzoek naar vaccins voor de mens als ook voor onderzoek naar behandeling bij het optreden van ziekte. Er bestaan nu in Europa geen vaccins tegen deze aandoening en het meest gebruikte medicijn ter behandelingen van zieke patiënten blijkt niet altijd werkzaam te zijn. Het virus is nauwelijks te kweken en daarom zijn dieren tot nu toe experimenteel alleen door gebruik van weefsel en faeces te infecteren. Daarmee zijn dierstudies moeilijk te standaardiseren. Zogenoemde infectieuze kopieën, die van genetisch materiaal van HEV gemaakt zijn, zijn succesvol voor de infectie met een andere HEV genotype (genotype 4) gebruikt en het is zeer waarschijnlijk dat een diermodel voor HEV 3 kan worden ontwikkeld en voor onderzoek naar vaccins tegen HEV 3 en naar behandeling van infecties met HEV genotype 3 te gebruiken. Doel van dit project is een reproduceerbaar diermodel van HEV 3 infecties in varkens te ontwikkelen en met dit model nieuwe vaccins voor mens of varken te testen en de werkzaamheid van antivirale middelen of andere medicatie ter behandeling van de ziekte te onderzoeken. |
| Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid | Dit onderzoek is gericht op de ontwikkeling van een geschikt diermodel om vervolgens nieuwe vaccins en nieuwe antivirale middelen voor de behandeling van hepatitis E patiënten te testen. Vaccins kunnen vooral voor mensen met een verzwakt immuunsysteem van belang zijn. Vaccinatie van varkens kan een geschikt middel zijn om HEV 3 vrije varkens te produceren en daarmee het risico van overdracht van dier op mens te verminderen.  |

tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

## VOORSPELDE SCHADE

| <p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>  | <p>Bij de ontwikkeling van het diermodel wordt het infectieuze materiaal eenmalig door intraveneuze toediening of door directe injectie in de lever toegediend. Voor de toediening in de lever worden de dieren onder narcose gebracht en de injectie van kleine hoeveelheden in de lever onder zicht controle uitgevoerd. De resultaten van de modelontwikkelings-studies bepalen of de experimentele infectie tijdens de vaccinatie of behandeling studies intraveneus of in de lever worden uitgevoerd. Voor en na infectie worden bloedmonsters genomen om hoeveelheid virus in het bloed en veranderingen ten gevolge van een leverontsteking te kunnen meten (frequentie ca. 10x). Bij het testen van nieuwe vaccins zullen deze een of tot drie keer toe in de spier of in de huid worden toegediend. De behandeling met antivirale middelen zal of oraal via mond of slokdarm of door injectie in de spier worden uitgevoerd. Tijdens vaccinatie- of behandelstudies worden monsters voor en na behandeling genomen (max. 10 x).</p> |                |  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |  |     |   |   |     |   |
|--|--|----------------|--|------------------------------------|---------|-------------|----------------|-------------|-------|-------|---------|--|-----|---|---|-----|---|
| <p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p> | <p>Natuurlijke infecties met HEV 3 infecties in het varken door orale opname verlopen zonder klinische verschijnselen en alleen in het leverweefsel zijn daarbij lichte ontstekingen te vinden. In het hier boogde model is de infectieroute door de intraveneuze toediening of toediening direct in de lever anders dan onder normale omstandigheden en is het infectieuze materiaal afkomstig van ernstig zieke patiënten. Dit kan ertoe leiden, dat er een ernstiger vorm van leverontsteking op gaat treden en dat ook klinische verschijnselen kunnen ontstaan met gewichtsverlies, verminderde activiteit en pijn door zwelling van de lever. De handelingen aan de dieren als ook de toedieningen of het verzamelen van bloedmonsters zullen tevens kortdurend ongerief veroorzaken.</p>  |                |  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |  |     |   |   |     |   |
| <p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>                                 | <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)</td> <td>304</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>304</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>   | Soort:         | Totaal aantal  | Geraamde aantallen naar ernstgraad |         |             |                | Terminaal   | Licht | Matig | Ernstig | Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> ) | 304 | 0 | 0 | 304 | 0 |
| Soort:   | Totaal aantal  |                |  | Geraamde aantallen naar ernstgraad |         |             |                |             |       |       |         |  |     |   |   |     |   |
|  |  | Terminaal      | Licht  | Matig                              | Ernstig |             |                |             |       |       |         |  |     |   |   |     |   |
| Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )   | 304  | 0              | 0  | 304                                | 0       |             |                |             |       |       |         |  |     |   |   |     |   |
| <p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>   | <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>   | Soort:         | Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren |                                    |         | Hergebruikt | Teruggeplaatst | Geadopteerd |       |       |         |  |     |   |   |     |   |
| Soort:   | Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren   |                |  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |  |     |   |   |     |   |
|  | Hergebruikt  | Teruggeplaatst | Geadopteerd  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |  |     |   |   |     |   |
|  |  |                |  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |  |     |   |   |     |   |
| <p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>  | <p>Na afloop van de studiefase worden de dieren gedood om weefsel voor verder onderzoek naar aanwezigheid van virus en naar pathologische veranderingen te onderzoeken.</p>  |                |  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |  |     |   |   |     |   |

## TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

|   |   |
|---|---|
| <p><b>1. Vervanging</b><br/>Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>   | <p>Onderzoeken naar HEV infecties worden in het laboratorium in celculturen en ook in complexere cel systemen uitgevoerd, echter zijn het ziekteproces en de vermindering van virus en de reductie van pathologische veranderingen voor het testen van bescherming na vaccinatie alleen in een dierstudie te onderzoeken.</p>   |
| <p><b>2. Vermindering</b><br/>Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p> | <p>Bij het vaststellen van het aantal dieren is rekening gehouden met studies die eerder uitgevoerd zijn, waarbij of vergelijkbaar infectiemateriaal of geïnfecteerd weefsel is gebruikt. Daarnaast is het aantal dieren, dat voor behandeling- of vaccinatiestudies gebruikt wordt, zo berekend dat er medisch-biologisch relevante verschillen aangetoond worden.</p>   |
| <p><b>3. Verfijning</b><br/>Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>  | <p>Alle handelingen aan de dieren zoals intraveneuze bloedmonsternamen, intraveneuze toediening en intrahepatische toediening worden door ervaren personeel uitgevoerd. In de acclimatisatieperiode wordt erop gelet, dat de dieren gewend raken aan handelingen. In de infectiefase worden de dieren ten minste twee keer per dag beoordeeld en afhankelijk van de ziekte ontwikkeling zal dit vaker gedaan worden. Humane eindpunten zijn vastgelegd om onnodige verlenging van een pijnperiode te voorkomen.</p>   |
| <p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>  | <p>Het onderzoek wordt in jonge varkens uitgevoerd omdat deze diersoort bekend is, gevoelig te zijn voor een infectie met HEV 3. Op een groot deel van de Nederlandse varkensbedrijven zijn varkens geïnfecteerd met het virus en vormen daarom ook een mogelijke bron voor infectie voor de mens. De infectie in varkens verloopt meestal zonder ziekteverschijnselen, echter door de keuze van het infectiemateriaal is de verwachting dat in ons model ook een ontsteking in de lever op gaat treden, net als bij de mens. Door de ontwikkeling van nieuwe vaccins en het testen in varkens is de verwachting dat zowel vaccins voor de mens als ook voor varkens kunnen worden getest. Tevens kunnen op grond van grote overeenkomstigheden in de immunologische afweer en in andere orgaanfuncties tussen mens en varken nieuwe behandelingen tegen HEV infecties bij de mens worden getest.</p> |

**VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT**

|  |     |
|--|-----|
| Project geselecteerd voor BA?                                | nee |
| Termijn voor BA  |     |
| <b>Reden voor de beoordeling achteraf</b>                    |     |
| Bevat ernstige procedures                                    |     |
| Maakt gebruik van niet-menselijke primaten                   |     |
| Andere reden   |     |
| Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf |     |

**AANVULLENDE VELDEN**

|   |  |
|---|--|
| Nationaal veld 1<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>          |  |
| Nationaal veld 2<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>          |  |
| Nationaal veld 3<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>          |  |
| Nationaal veld 4<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>          |  |
| Nationaal veld 5<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>          |  |
| Startdatum project<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>        |  |
| Einddatum project<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>         |  |
| Goedkeuringsdatum project<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i> |  |
| ICD-code 1<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>                |  |
| ICD-code 2<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>                |  |
| ICD-code 3<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>                |  |
| Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem      |  |





## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
www.centralecommissiedierproeven.nl

Datum 24 september 2021

Betreft Aanvullende adviesnota AVD202114785

Project: Development of a Hepatis E genotype 3 animal model and use in vaccine and treatment

#### Proces

In de CCD vergadering van 10 september 2021 is deze aanvraag besproken (zie map 'originele aanvraag'). **5.1 lid2h** voor het opzetten van een HEV type 3 ziektemodel in varkens en het testen van vaccins voor varkens en mensen tegen HEV type 3 in het model. In de aanvraag zaten toen nog te veel onduidelijkheden, met name over de haalbaarheid, 3V's en humane eindpunten. Er is besloten de aanvrager (nog de kans te geven) deze punten aan te vullen en toe te lichten.

#### Onduidelijkheden

Na de vergadering zijn de volgende vragen gesteld aan de aanvrager:

- 1) U geeft aan dat u het diermodel voor 2 doelen wilt gebruiken: enerzijds het ontwikkelen van humane vaccins voor mensen met een verhoogd risico op HEV 3 besmetting en anderzijds het ontwikkelen van vaccins voor gebruik in varkens teneinde vlees te produceren dat gegarandeerd vrij is van HEV 3. De CCD vindt de eerste doelstelling realistisch maar heeft twijfels bij de tweede. Om infectie bij mensen zoveel mogelijk te voorkomen zou de hele veestapel gevaccineerd moeten worden. De CCD weet niet in hoeverre dit in werkelijkheid ook zou gebeuren. De varkens zelf hebben immers geen last van een infectie en de humane doelgroep is klein. Kunt u toelichten waarom u toch denkt dat dit kans van slagen heeft?
- 2) U geeft in het projectvoorstel getallen weer over het voorkomen van HEV 3 in Europa en Nederland. Kunt u ook iets zeggen over het aantal sterfgevallen, wereldwijd en in Nederland specifiek, gelinkt aan HEV 3?
- 3) Bij de bijlagen, onder A, beschrijft u niet hoe lang de experimenten maximaal duren voor de varkens. Kunt u dit nog aangeven? Dit is voor de CCD nodig om een goede inschatting van het ongerief te kunnen maken.
- 4) Bij de bijlagen, vraag B geeft u niet aan of u varkens van beide geslachten gebruikt of van één geslacht. Kunt u dit nog aanvullen? Bij het gebruik van één geslacht graag ook een onderbouwing geven waarom dit nodig is om de doelstellingen te behalen.
- 5) Kunt u bij de bijlagen, onder vraag D dieper ingaan op vervanging? U geeft aan dat u alternatieven heeft onderzocht en dat deze niet haalbaar waren. Kunt u toevoegen welke alternatieven er beschikbaar zijn en waarom deze niet kunnen

**Met opmerkingen 5.1.1(1):** Klinkt een beetje denigrerend/ultimatief. Ik zou zeggen Er is besloten de aanvrager te verzoeken om...

bijdragen aan het behalen van de doelstellingen van dit project?

6) Bij de bijlagen, vraag D, onder verfijning geeft u een motivering voor de keuze voor het diemodel. Kunt u hier ook ingaan op de translationele waarde naar de mens voor het ontwikkelen van vaccins voor patiënten? En kunt u hier ook ingaan op de onnatuurlijke wijze van infectie?

7) Bij de bijlagen, vraag D staat de vraag: "Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment." U gaat hier niet in op de maatregelen die u neemt om het lijden van de dieren zoveel mogelijk te vermijden. Kunt u dit alsnog doen?

8) Bij vraag J geeft u algemene humane eindpunten. Kunt u ook humane eindpunten formuleren die specifiek bij deze infectie zouden kunnen passen? U geeft aan dat de dieren maximaal matig ongerief zullen ondergaan, de humane eindpunten moeten zo gekozen zijn dat ernstig ongerief wordt uitgesloten.

9) Ook geeft u bij vraag J van de bijlagen aan dat u niet verwacht dat de varkens ernstig ziek worden door de route van infectie. Toch geeft u daaronder aan dat verwacht wordt dat bij 25% een humaan eindpunt zal worden toegepast (10% in bijlage 2). Kunt u verklaren waarom u zo'n hoog percentage opgeeft als u niet verwacht dat de dieren ernstig ziek worden?

10) U heeft als beoogde startdatum 01-02-2021 ingevuld, terwijl uw aanvraag pas in april door ons ontvangen is. Wilt u de looptijd van uw aanvraag nog wijzigen? U hoeft ons daarvoor geen nieuw aanvraagformulier te sturen, een antwoord op deze vraag volstaat.

#### Reactie aanvrager

De reactie van de aanvrager op bovenstaande vragen:

Bijgevoegd stuur ik de antwoorden op de opgemerkte onduidelijkheden in aanvraag AVD20214785. In de antwoorden heb ik aangegeven of er wijzigingen in de aanvraag zijn gemaakt. Daarnaast stuur ik de aanvraag met in kleur weergegeven de wijzigingen. Ik hoop, dat het voldoende helder is.

1) De inschatting dat een HEV vaccin in bepaalde onderdelen van de varkens productieketen is zeker denkbaar. Hierbij is vooral aan top-fokbedrijven te denken, omdat deze dieren voor de vermeerderings- en vleesbedrijven leveren. Deze top-fok bedrijven nemen over het algemeen hun verantwoordelijkheid als het om zoonose vraagstukken gaat. In mijn antwoord naar de DEC had ik al op de inschatting betreffende het nut van vaccins in varkens door een recente publicatie Meester et al. 2021, afkomstig van de veterinaire faculteit UU gewezen. Geen wijziging in tekst

2) Ik heb helaas geen mortaliteitscijfers voor NL kunnen vinden, maar zoals reeds in de antwoord naar de DEC aangegeven worden ca. 50% van de gediagnosticeerde gevallen in het ziekenhuis opgenomen. Omdat het hierbij vaak om immuun-gecompromitteerde patiënten gaat en hepatitis zich chronisch kan manifesteren is HEV niet eenduidig als sterfteoorzaak vastgesteld. Maar in ethische perspectief lijkt mij ok het verlies aan levenskwaliteit en ziekedagen een hoog goed. Geen wijziging in tekst.

Met opmerkingen [524(2):5.2 lid1

Met opmerkingen [524(3):5.2 lid1

3) In de eerste paragraaf van beide bijlagen was de volgende informatie verstrekt.  
" After inoculation pigs will be followed up to 6 weeks."

" After challenge inoculation with the infectious cDNA clone pigs will be followed up to 6 weeks."

Is dit voldoende? Geen wijziging in tekst.

Met opmerkingen [524(4):5.2 lid1].

4) Bij de bijlagen, vraag B geeft u niet aan of u varkens van beide geslachten gebruikt of van één geslacht. Kunt u dit nog aanvullen? Bij het gebruik van één geslacht graag ook een onderbouwing geven waarom dit nodig is om de doelstellingen te behalen.

Response: De vraag bij B is naar mijn informatie: "Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices. Hierop is in de aanvraag antwoord gegeven, er is geen vraag naar sex hierin; voor deze studies kunnen beide geslachten worden gebruikt, maar meestal gebruiken wij mannelijke dieren, omdat de leverancier graag de vrouwelijke dieren voor fokdoeleinden wil gebruiken en het voor onze vraagstelling op dit moment niet relevant is of het beertjes of zeugjes zijn. Gewijzigd.

Met opmerkingen [514(5):5.2 lid1], geen in voorraad gedood dus.

5) Excuses als de indruk is ontstaan, dat er wel een alternatief zou kunnen zijn. Dit is niet het geval, het HEV virus is niet kweekbaar en daarom vallen ook alle in-vitro mogelijkheden weg om directe hepatotoxische/-cellulaire effecten aan te tonen; om inflammatoire leververanderingen en hepatitis te onderzoeken zijn zeker geen alternatieven voor handen. Gewijzigd.

Met opmerkingen [514(6):5.2 lid1] andere diersoorten waren geloof ik al uitgesloten omdat het varken het doeldier en de bron is en het dichtsbij de mens staat, toch?

6) Response: In het projectvoorstel is een korte vergelijking tussen de beschikbare diermodellen gedaan; de reden waarom het varken als een goed model voor de mens wordt gezien is het feit dat HEV voor deze species natuurlijk besmettelijk is; daarnaast is het varken genetisch en in zijn immunologische reacties zeer vergelijkbaar met de mens. Wij zijn ons bewust van de onnatuurlijke wijze van infectie, achten echter de kans van infectie van levercellen op deze wijze hoger en verwachten daarmee ook een betere mogelijkheid te hebben om immunologische of anti-inflammatoire processen te kunnen bestuderen. Aangepast.

Met opmerkingen [514(7):5.2 lid1]: Dat bedoelde ik dus! Had ik t toch goed herinnerd! 😊

7) ik meen mij te herinneren, dat met de CCD is afgesproken, dat deel 1 van deze vraag niet beantwoord hoeft te worden, omdat de antwoorden in onderdelen H, I, J en K ingesloten zijn.

Ik heb nu een antwoord ingevoegd.

Met opmerkingen [514(8):5.2 lid1]

8) Nee, normaliter verloopt een HEV infectie in varkens zonder symptomen, maar omdat dit voor ons nieuw is en wij daarnaast genetisch materiaal van HEV virussen gebruiken, die van mensen geïsoleerd zijn, die een hepatitis hebben ontwikkeld is niet uit te sluiten, dat er ziekteverschijnselen zullen ontstaan. Op het moment kunnen wij geen specifiekere HEP's formuleren en zullen vooral volgens good veterinary practice handelen. Aangepast in tekst.

Met opmerkingen [514(9):5.2 lid1]: Misschien even bijzetten?  
To minimize animal suffering, pain or fear the following measure are taken: animals will be treated under anesthesia when necessary (see below) and animals are kept in a group with environmental enrichment materials and will be observed at least twice daily by experienced animal caretakers and all manipulations will be performed by experienced care takers.

9) Deze aanname heeft te maken met een klein aantal dieren in een groep; als er 2 van 8 dieren klinische verschijnselen zouden tonen, die bij een HEP passen zijn dit al 25%; maar zoals aangegeven hebben wij geen onderbouwing hiervoor. Ik wil het daarom toch laten staan.

Met opmerkingen [524(10):5.2 lid1]

10) gewijzigd.

**NB. Het Secretariaat heeft bij het stellen van de vragen per fout niet de vragen over de NTS gesteld. Dat heeft het Secretariaat alsnog gedaan, de**

**antwoorden hierop worden in de vergadering ingebracht, indien op tijd ontvangen. De vragen zijn:**

- Het wordt uit de NTS niet duidelijk hoe groot het probleem van HEV type 3 is. De 300.000 doden en miljoenen infecties wereldwijd worden voornamelijk door andere types veroorzaakt. Kunt u cijfers geven hoeveel besmettingen en doden er door HEV type 3 veroorzaakt worden?
- Het doel van de NTS is om het publiek te informeren over projecten waarvoor een vergunning is verleend. Daarom is de NTS in het Nederlands met een voor een breed publiek begrijpelijk taalgebruik. U gebruikt enkele moeilijke termen in de NTS, zoals faeces, intraveneuze en intrahepatische toediening, complexere cel systemen en pathologische veranderingen. Kunt u in de nieuwe versie van de NTS eenvoudiger taal gebruiken of moeilijke termen uitleggen?
- Kunt u de secties over de 3V's aanvullen? Er is onvoldoende inzicht in waarom er dierproeven nodig zijn, waarom er niet met minder dieren gewerkt kan worden en waarom dit de meest verijnde opzet is.
- Kunt u onder "expected impacts/adverse effects" nog toevoegen dat de dieren gedood worden in het kader van de proef?

**Voorstel Secretariaat**

5.2 lid1  
[Redacted text block]

- Met opmerkingen [5.14] (11): Voldoende
- Met opmerkingen [5.14] (12): Naar behoren
- Met opmerkingen [5.14] (13): 5.2 lid1  
[Redacted comment]
- Met opmerkingen [5.14] (14): 5.2 lid1  
[Redacted comment]
- Met opmerkingen [5.14] (15): Het blijft echte ronzekeer
- Met opmerkingen [5.14] (16): Zou wat mij betreft weg mogen, dit kunnen ze lezen in de antwoorden hierboven.
- Met opmerkingen [5.14] (17): Alternatief; En de vragen over de NTS 5.2 lid1  
[Redacted comment]



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
www.centralecommissiedierproeven.nl

Datum 24 september 2021

Betreft Aanvullende adviesnota AVD202114785

Project: Development of a Hepatis E genotype 3 animal model and use in vaccine and treatment

### Proces

In de CCD vergadering van 10 september 2021 is deze aanvraag besproken (zie map 'originele aanvraag'). [5.1 lid 2h](#)

voor het opzetten van een HEV type 3 ziektemodel in varkens en het testen van vaccins voor varkens en mensen tegen HEV type 3 in het model. In de aanvraag zaten toen nog te veel onduidelijkheden, met name over de haalbaarheid, 3V's en humane eindpunten. Er is besloten de aanvrager nog de kans te geven deze punten aan te vullen en toe te lichten.

### Onduidelijkheden

Na de vergadering zijn de volgende vragen gesteld aan de aanvrager:

- 1) U geeft aan dat u het diermodel voor 2 doelen wilt gebruiken: enerzijds het ontwikkelen van humane vaccins voor mensen met een verhoogd risico op HEV 3 besmetting en anderzijds het ontwikkelen van vaccins voor gebruik in varkens teneinde vlees te produceren dat gegarandeerd vrij is van HEV 3. De CCD vindt de eerste doelstelling realistisch maar heeft twijfels bij de tweede. Om infectie bij mensen zoveel mogelijk te voorkomen zou de hele veestapel gevaccineerd moeten worden. De CCD weet niet in hoeverre dit in werkelijkheid ook zou gebeuren. De varkens zelf hebben immers geen last van een infectie en de humane doelgroep is klein. Kunt u toelichten waarom u toch denkt dat dit kans van slagen heeft?
- 2) U geeft in het projectvoorstel getallen weer over het voorkomen van HEV 3 in Europa en Nederland. Kunt u ook iets zeggen over het aantal sterfgevallen, wereldwijd en in Nederland specifiek, gelinkt aan HEV 3?
- 3) Bij de bijlagen, onder A, beschrijft u niet hoe lang de experimenten maximaal duren voor de varkens. Kunt u dit nog aangeven? Dit is voor de CCD nodig om een goede inschatting van het ongerief te kunnen maken.
- 4) Bij de bijlagen, vraag B geeft u niet aan of u varkens van beide geslachten gebruikt of van één geslacht. Kunt u dit nog aanvullen? Bij het gebruik van één geslacht graag ook een onderbouwing geven waarom dit nodig is om de doelstellingen te behalen.
- 5) Kunt u bij de bijlagen, onder vraag D dieper ingaan op vervanging? U geeft aan dat u alternatieven heeft onderzocht en dat deze niet haalbaar waren. Kunt u toevoegen welke alternatieven er beschikbaar zijn en waarom deze niet kunnen

bijdragen aan het behalen van de doelstellingen van dit project?

6) Bij de bijlagen, vraag D, onder verfijning geeft u een motivering voor de keuze voor het diermodel. Kunt u hier ook ingaan op de translationele waarde naar de mens voor het ontwikkelen van vaccins voor patiënten? En kunt u hier ook ingaan op de onnatuurlijke wijze van infectie?

7) Bij de bijlagen, vraag D staat de vraag: "Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment." U gaat hier niet in op de maatregelen die u neemt om het lijden van de dieren zoveel mogelijk te vermijden. Kunt u dit alsnog doen?

8) Bij vraag J geeft u algemene humane eindpunten. Kunt u ook humane eindpunten formuleren die specifiek bij deze infectie zouden kunnen passen? U geeft aan dat de dieren maximaal matig ongerief zullen ondergaan, de humane eindpunten moeten zo gekozen zijn dat ernstig ongerief wordt uitgesloten.

9) Ook geeft u bij vraag J van de bijlagen aan dat u niet verwacht dat de varkens ernstig ziek worden door de route van infectie. Toch geeft u daaronder aan dat verwacht wordt dat bij 25% een humaan eindpunt zal worden toegepast (10% in bijlage 2). Kunt u verklaren waarom u zo'n hoog percentage opgeeft als u niet verwacht dat de dieren ernstig ziek worden?

10) U heeft als beoogde startdatum 01-02-2021 ingevuld, terwijl uw aanvraag pas in april door ons ontvangen is. Wilt u de looptijd van uw aanvraag nog wijzigen? U hoeft ons daarvoor geen nieuw aanvraagformulier te sturen, een antwoord op deze vraag volstaat.

### **Reactie aanvrager**

De reactie van de aanvrager op bovenstaande vragen:

Bijgevoegd stuur ik de antwoorden op de opgemerkte onduidelijkheden in aanvraag AVD20214785. In de antwoorden heb ik aangegeven of er wijzigingen in de aanvraag zijn gemaakt. Daarnaast stuur ik de aanvraag met in kleur weergegeven de wijzigingen. Ik hoop, dat het voldoende helder is.

1) De inschatting dat een HEV vaccin in bepaalde onderdelen van de varkens productieketen is zeker denkbaar. Hierbij is vooral aan top-fokbedrijven te denken, omdat deze dieren voor de vermeerderings- en vleesbedrijven leveren. Deze top-fok bedrijven nemen over het algemeen hun verantwoordelijkheid als het om zoonose vraagstukken gaat. In mijn antwoord naar de DEC had ik al op de inschatting betreffende het nut van vaccins in varkens door een recente publicatie Meester et al. 2021, afkomstig van de veterinaire faculteit UU gewezen. Geen wijziging in tekst

2) Ik heb helaas geen mortaliteitscijfers voor NL kunnen vinden, maar zoals reeds in de antwoord naar de DEC aangegeven worden ca. 50% van de gediagnosticeerde gevallen in het ziekenhuis opgenomen. Omdat het hierbij vaak om immuun-gecompromitteerde patiënten gaat en hepatitis zich chronisch kan manifesteren is HEV niet eenduidig als sterfteoorzaak vastgesteld. Maar in ethische perspectief lijkt mij ok het verlies aan levenskwaliteit en ziekte dagen een hoog goed. Geen wijziging in tekst.

3) In de eerste paragraaf van beide bijlagen was de volgende informatie verstrekt.  
" After inoculation pigs will be followed up to 6 weeks."  
" After challenge inoculation with the infectious cDNA clone pigs will be followed up to 6 weeks."

Is dit voldoende? Geen wijziging in tekst.

4) Bij de bijlagen, vraag B geeft u niet aan of u varkens van beide geslachten gebruikt of van één geslacht. Kunt u dit nog aanvullen? Bij het gebruik van één geslacht graag ook een onderbouwing geven waarom dit nodig is om de doelstellingen te behalen.

Response: De vraag bij B is naar mijn informatie: "Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices. Hierop is in de aanvraag antwoord gegeven, er is geen vraag naar sex hierin; voor deze studies kunnen beide geslachten worden gebruikt, maar meestal gebruiken wij mannelijke dieren, omdat de leverancier graag de vrouwelijke dieren voor fokdoeleinden wil gebruiken en het voor onze vraagstelling op dit moment niet relevant is of het beertjes of zeugjes zijn. Gewijzigd.

5) Excuses als de indruk is ontstaan, dat er wel een alternatief zou kunnen zijn. Dit is niet het geval, het HEV virus is niet kweekbaar en daarom vallen ook alle in-vitro mogelijkheden weg om directe hepatotoxische/-cellulaire effecten aan te tonen; om inflammatoire leververanderingen en hepatitis te onderzoeken zijn zeker geen alternatieven voor handen. Gewijzigd.

6) Response: In het projectvoorstel is een korte vergelijking tussen de beschikbare diermodellen gedaan; de reden waarom het varken als een goed model voor de mens wordt gezien is het feit dat HEV voor deze species natuurlijk besmettelijk is; daarnaast is het varken genetisch en in zijn immunologische reacties zeer vergelijkbaar met de mens. Wij zijn ons bewust van de onnatuurlijke wijze van infectie, achten echter de kans van infectie van levercellen op deze wijze hoger en verwachten daarmee ook een betere mogelijkheid te hebben om immunologische of anti-inflammatoire processen te kunnen bestuderen. Aangepast.

7) ik meen mij te herinneren, dat met de CCD is afgesproken, dat deel 1 van deze vraag niet beantwoord hoeft te worden, omdat de antwoorden in onderdelen H, I, J en K ingesloten zijn.  
Ik heb nu een antwoord ingevoegd.

8) Nee, normaliter verloopt een HEV infectie in varkens zonder symptomen, maar omdat dit voor ons nieuw is en wij daarnaast genetisch materiaal van HEV virussen gebruiken, die van mensen geïsoleerd zijn, die een hepatitis hebben ontwikkeld is niet uit te sluiten, dat er ziekteverschijnselen zullen ontstaan. Op het moment kunnen wij geen specifiekere HEP's formuleren en zullen vooral volgens good veterinary practice handelen. Aangepast in tekst.

9) Deze aanname heeft te maken met een klein aantal dieren in een groep; als er 2 van 8 dieren klinische verschijnselen zouden tonen, die bij een HEP passen zijn dit al 25%; maar zoals aangegeven hebben wij geen onderbouwing hiervoor. Ik wil het daarom toch laten staan.

10) gewijzigd.

**NB. Het Secretariaat heeft bij het stellen van de vragen per fout niet de vragen over de NTS gesteld. Dat heeft het Secretariaat alsnog gedaan, de**

**antwoorden hierop worden in de vergadering ingebracht, indien op tijd ontvangen. De vragen zijn:**

- Het wordt uit de NTS niet duidelijk hoe groot het probleem van HEV type 3 is. De 300.000 doden en miljoenen infecties wereldwijd worden voornamelijk door andere types veroorzaakt. Kunt u cijfers geven hoeveel besmettingen en doden er door HEV type 3 veroorzaakt worden?

- Het doel van de NTS is om het publiek te informeren over projecten waarvoor een vergunning is verleend. Daarom is de NTS in het Nederlands met een voor een breed publiek begrijpelijk taalgebruik. U gebruikt enkele moeilijke termen in de NTS, zoals faeces, intraveneuze en intrahepatische toediening, complexere cel systemen en pathologische veranderingen. Kunt u in de nieuwe versie van de NTS eenvoudiger taal gebruiken of moeilijke termen uitleggen?

- Kunt u de secties over de 3V's aanvullen? Er is onvoldoende inzicht in waarom er dierproeven nodig zijn, waarom er niet met minder dieren gewerkt kan worden en waarom dit de meest verfijnde opzet is.

- Kunt u onder "expected impacts/adverse effects" nog toevoegen dat de dieren gedood worden in het kader van de proef?

**Voorstel Secretariaat**

5.2 lid1

[Redacted text block]

[Redacted text block]



---

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** vrijdag 24 september 2021 12:22  
**Aan:** 5.1 lid2h  
**CC:** 5.1 lid2e 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202114785

Geachte 5.1 lid2e,

Op 06-04-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Development of a Hepatis E genotype 3 animal model and use in vaccine and treatment" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202114785. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

### Welke informatie nog nodig

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

#### Niet technische samenvatting

- Het wordt uit de NTS niet duidelijk hoe groot het probleem van HEV type 3 is. De 300.000 doden en miljoenen infecties wereldwijd worden voornamelijk door andere types veroorzaakt. Kunt u cijfers geven hoeveel besmettingen en doden er door HEV type 3 veroorzaakt worden?
- Het doel van de NTS is om het publiek te informeren over projecten waarvoor een vergunning is verleend. Daarom is de NTS in het Nederlands met een voor een breed publiek begrijpelijk taalgebruik. U gebruikt enkele moeilijke termen in de NTS, zoals faeces, intraveneuze en intrahepatische toediening, complexere cel systemen en pathologische veranderingen. Kunt u een nieuwe NTS sturen zonder moeilijke woorden, of waarin deze worden uitgelegd?
- Kunt u de secties over de 3V's aanvullen? Er is onvoldoende inzicht in waarom er dierproeven nodig zijn, waarom er niet met minder dieren gewerkt kan worden en waarom dit de meest verfijnde opzet is.
- Kunt u onder "expected impacts/adverse effects" nog toevoegen dat de dieren gedood worden in het kader van de proef?

#### Onduidelijkheden

Wij hebben de antwoorden op de door ons gestelde vragen in goede orde ontvangen, waarvoor dank. Bij het stellen van de vragen waren door een fout de vragen over de NTS niet meegekomen in de automatisch gegenereerde mail, bij deze worden deze alsnog gestuurd.

Daarnaast begrijpen wij niet uw antwoord op de vraag over het eventuele wijzigen van de start en einddatum. U geeft aan "gewijzigd", maar u heeft geen nieuwe datum opgegeven zover wij kunnen vinden. Kunt u deze alsnog doorgeven zodat deze op de eventuele vergunning juist geplaatst kan worden?

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

#### Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via

NetFTP.

Uw aanvraag zal opnieuw in de CCD vergadering worden besproken op 1 oktober.

**Wanneer een beslissing**

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

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....  
T: 0900 2800028

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

AAN  
Bureau CCD

VAN  
5.1 lid2e  
20 september 2021

Geachte 5.1 lid2e ,

Bijgevoegd stuur ik de antwoorden op de opgemerkte onduidelijkheden in aanvraag AVD 4010020214785 in u email van 24Sep2021. In de antwoorden heb ik aangegeven of er wijzigingen in de aanvraag zijn gemaakt. Daarnaast stuur ik de aanvraag met in kleur weergegeven de wijzigingen.

Ik hoop, dat het voldoende helder is,

### Niet technische samenvatting

- Het wordt uit de NTS niet duidelijk hoe groot het probleem van HEV type 3 is. De 300.000 doden en miljoenen infecties wereldwijd worden voornamelijk door andere types veroorzaakt. Kunt u cijfers geven hoeveel besmettingen en doden er door HEV type 3 veroorzaakt worden?

*Response:* ....Het in Europa voorkomende genotype 3 (HEV 3) wordt ook als een veroorzaker van hepatitis in de mens gezien. In Europa is er een toename van HEV3 klinische gevallen gezien met 514 gevallen in 2005 oplopend tot 5617 gevallen in 2017. Ook in Nederland is het aantal stijgend en zijn er nu tussen 160 tot 300 klinische gevallen per jaar....

- Het doel van de NTS is om het publiek te informeren over projecten waarvoor een vergunning is verleend. Daarom is de NTS in het Nederlands met een breed publiek begrijpelijk taalgebruik. U gebruikt enkele moeilijke termen in de NTS, zoals faeces, intraveneuze en intrahepatische toediening, complexere cel systemen en pathologische veranderingen. Kunt u een nieuwe NTS sturen zonder moeilijke woorden, of waarin deze worden uitgelegd?

*Response:* woorden zijn vervangen door:

- Kunt u de secties over de 3V's aanvullen? Er is onvoldoende inzicht in waarom er dierproeven nodig zijn, waarom er niet met minder dieren gewerkt kan worden en waarom dit de meest verfijnde opzet is.

*Response:*

- Kunt u onder "expected impacts/adverse effects" nog toevoegen dat de dieren gedood worden in het kader van de proef?

*Response:* is toegevoegd

## Memo

5.1 lid2h

DATUM  
28 september 2021

ONDERWERP  
AVD5.1 lid2h 20214785

POSTADRES  
5.1 lid2h

BEZOEKADRES  
5.1 lid2h

INTERNET  
5.1 lid2h

CONTACTPERSOON  
5.1 lid2e

TELEFOON  
5.1 lid2e

E-MAIL  
5.1 lid2e

5.1 lid2h

DATUM  
20 september 2021

PAGINA  
2 van 2

Daarnaast begrijpen wij niet uw antwoord op de vraag over het eventuele wijzigen van de start en einddatum. U geeft aan "gewijzigd", maar u heeft geen nieuwe datum opgegeven zover wij kunnen vinden. Kunt u deze alsnog doorgeven zodat deze op de eventuele vergunning juist geplaatst kan worden?

*Response:* Dit is vreemd in mijn versie van het de front page staat wel 1/11/2021.

Met vriendelijke groeten

5.1 lid2h

|  |   |
|--|---|
| Naam van het project   | Ontwikkeling van een hepatitis E genotype 3 diermodel voor vaccinatie en interventiestudies in varkens  |
| NTS-identificatiecode  | NTS-NL-242127 v.1   |
| Nationale identificatiecode van de NTS<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i> |   |
| Land   | Nederland   |
| Taal   | nl  |
| Indiening bij EU<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>                       | ja  |
| Duur van het project, uitgedrukt in maanden.                                   | 60  |
| Trefwoorden  | Hepatitis<br>vaccins<br>antivirale middelen<br>HEV<br>varken  |
| Doel(en) van het project   | Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Besmettelijke ziekten van de mens<br>Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Ziekten en aandoeningen van dieren |

#### DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

|   |   |
|---|---|
| Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).                  | Hepatitis E virus veroorzaakt acute en chronische leverontsteking (Hepatitis E) met jaarlijks meerdere miljoenen infecties en ca. 300.000 doden wereldwijd. De meeste infecties komen voor in Azië, maar ook in Europa worden regelmatig gevallen gezien vooral bij patiënten met een verzwakt immuun systeem. Het virus komt voor in vier verschillende genotypen, waarbij de genotype 1 en 2 de meest belangrijke oorzaak van hepatitis E zijn en voornamelijk in Aziatische landen voorkomen. Het in Europa voorkomende genotype 3 (HEV 3) wordt ook als een veroorzaker van hepatitis in de mens gezien. In Europa is er een toename van HEV3 klinische gevallen gezien met 514 gevallen in 2005 oplopend tot 5617 gevallen in 2017. Ook in Nederland is het aantal stijgend en zijn er nu tussen 160 tot 300 klinische gevallen per jaar. HEV 3 komt veelvuldig in varkens voor en zowel de dieren als ook producten van varkens kunnen een risico voor overdracht naar de mens vormen. Omdat het varken ook een natuurlijk gastheer van HEV is, kan het een geschikt diermodel zijn. Een dergelijk diermodel is belangrijk voor vaccinonderzoek naar vaccins voor de mens als ook voor varkens en voor onderzoek naar behandeling bij het optreden van ziekte. Er bestaan nu in Europa geen vaccins tegen deze aandoening en het meest gebruikte medicijn ter behandelingen van zieke patiënten blijkt niet altijd werkzaam te zijn. Het virus is nauwelijks te kweken en daarom zijn dieren tot nu toe experimenteel alleen door gebruik van weefsel en/of mest te infecteren. Daarmee zijn dierstudies moeilijk te standaardiseren. Zogenoemde infectieuze kopieën, die van genetisch materiaal van HEV gemaakt zijn, zijn succesvol voor de infectie met een andere HEV genotype (genotype 4) gebruikt en het is zeer waarschijnlijk dat een diermodel voor HEV 3 kan worden ontwikkeld en voor onderzoek naar vaccins tegen HEV 3 en naar behandeling van infecties met HEV genotype 3 te gebruiken. Doel van dit project is een reproduceerbaar diermodel van HEV 3 infecties in varkens te ontwikkelen en met dit model nieuwe vaccins voor mens of varken te testen en de werkzaamheid van antivirale middelen of andere medicatie ter behandeling van de ziekte te onderzoeken. |
| Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het | Dit onderzoek is gericht op de ontwikkeling van een geschikt diermodel om vervolgens nieuwe vaccins en nieuwe antivirale middelen voor de behandeling van hepatitis E patiënten te testen. Vaccins kunnen vooral voor mensen met een verzwakt immuunsysteem van belang zijn. Vaccinatie van varkens kan een geschikt middel zijn om HEV 3 vrije varkens te produceren en daarmee het risico van overdracht van dier op mens te verminderen.   |

project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

**VOORSPELDE SCHADE**

| <p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>  | <p>Bij de ontwikkeling van het diermodel wordt het infectieuze materiaal eenmalig door toediening in de aderen of door directe injectie in de lever toegediend. Voor de toediening in de lever worden de dieren onder narcose gebracht en de injectie van kleine hoeveelheden in de lever onder zicht controle uitgevoerd. De resultaten van de modelontwikkelings-studies bepalen of de experimentele infectie tijdens de vaccinatie of behandeling studies intraveneus of in de lever worden uitgevoerd. Voor en na infectie worden bloedmonsters genomen om hoeveelheid virus in het bloed en veranderingen ten gevolge van een leverontsteking te kunnen meten (frequentie ca. 10x). Bij het testen van nieuwe vaccins zullen deze een of tot drie keer toe in de spier of in de huid worden toegediend. De behandeling met antivirale middelen zal of oraal via mond of slokdarm of door injectie in de spier worden uitgevoerd. Tijdens vaccinatie- of behandelstudies worden monsters voor en na behandeling genomen (max. 10 x).</p> |                |  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |  |     |   |   |     |   |
|--|--|----------------|--|------------------------------------|---------|-------------|----------------|-------------|-------|-------|---------|--|-----|---|---|-----|---|
| <p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p> | <p>Natuurlijke infecties met HEV 3 infecties in het varken door orale opname verlopen zonder klinische verschijnselen en alleen in het leverweefsel zijn daarbij lichte ontstekingen te vinden. In het hier boogde model is de infectieroute door de intraveneuze toediening of toediening direct in de lever anders dan onder normale omstandigheden en is het infectieuze materiaal afkomstig van ernstig zieke patiënten. Dit kan ertoe leiden, dat er een ernstiger vorm van leverontsteking op gaat treden en dat ook klinische verschijnselen kunnen ontstaan met gewichtsverlies, verminderde activiteit en pijn door zwelling van de lever. De handelingen aan de dieren als ook de toedieningen of het verzamelen van bloedmonsters zullen tevens kortdurend ongerief veroorzaken. Aan het einde van de onderzoeksfase worden de dieren gedood om weefsels voor verder onderzoek te verzamelen</p>  |                |  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |  |     |   |   |     |   |
| <p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>                                 | <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)</td> <td>304</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>304</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>   | Soort:         | Totaal aantal  | Geraamde aantallen naar ernstgraad |         |             |                | Terminaal   | Licht | Matig | Ernstig | Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> ) | 304 | 0 | 0 | 304 | 0 |
| Soort:   | Totaal aantal  |                |  | Geraamde aantallen naar ernstgraad |         |             |                |             |       |       |         |  |     |   |   |     |   |
|  |  | Terminaal      | Licht  | Matig                              | Ernstig |             |                |             |       |       |         |  |     |   |   |     |   |
| Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )   | 304  | 0              | 0  | 304                                | 0       |             |                |             |       |       |         |  |     |   |   |     |   |
| <p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>   | <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>   | Soort:         | Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren |                                    |         | Hergebruikt | Teruggeplaatst | Geadopteerd |       |       |         |  |     |   |   |     |   |
| Soort:   | Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren   |                |  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |  |     |   |   |     |   |
|  | Hergebruikt  | Teruggeplaatst | Geadopteerd  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |  |     |   |   |     |   |
|  |  |                |  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |  |     |   |   |     |   |
| <p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>  | <p>Na afloop van de studiefase worden de dieren gedood om weefsel voor verder onderzoek naar aanwezigheid van virus en naar ziektegerelateerde veranderingen te onderzoeken.</p>   |                |  |                                    |         |             |                |             |       |       |         |  |     |   |   |     |   |

## TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

### 1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

Onderzoeken naar HEV infecties worden in het laboratorium in celculturen en ook in gekweekte orgaan-achtige systemen uitgevoerd, echter zijn het ziekteproces en de vermindering van virus en de reductie van ziektegerelateerde veranderingen voor het testen van bescherming na vaccinatie alleen in een dierstudie te onderzoeken. In het laboratorium zijn alleen aan kweekcellen aangepaste HEV3 virussen voor onderzoek beschikbaar. HEV3 virussen, die bij de mens vastgesteld zijn kunnen niet in cellen worden gekweekt en daarom kan hiermee alleen in dieren worden gewerkt. Ook is onderzoek naar ontstekingsreacties en immuunreacties, bijv. na vaccinatie alleen in dieren te onderzoeken.

### 2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Bij het vaststellen van het aantal dieren is rekening gehouden met studies die eerder uitgevoerd zijn, waarbij of vergelijkbaar infectiemateriaal of geïnfecteerd weefsel is gebruikt. Daarnaast is het aantal dieren, dat voor behandeling- of vaccinatiestudies gebruikt wordt, zo berekend dat er medisch-biologisch belangrijke verschillen aangetoond worden.

### 3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

Alle handelingen aan de dieren zoals bloedmonstername, toediening in de aderen en gerichte toediening in de lever worden door ervaren personeel uitgevoerd. In de wening periode voorafgaande aan behandelingen wordt erop gelet, dat de dieren gewend raken aan handelingen. In de fase na infectie worden de dieren ten minste twee keer per dag beoordeeld en afhankelijk van de ziekte ontwikkeling zal dit vaker gedaan worden. Humane eindpunten zijn vastgelegd om onnodige verlenging van een pijnperiode te voorkomen.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

Het onderzoek wordt in jonge varkens uitgevoerd omdat deze diersoort bekend is, gevoelig te zijn voor een infectie met HEV 3. Op een groot deel van de Nederlandse varkensbedrijven zijn varkens geïnfecteerd met het virus en vormen daarom ook een mogelijke bron voor infectie voor de mens. De infectie in varkens verloopt meestal zonder ziekteverschijnselen, echter door de keuze van het infectiemateriaal is de verwachting dat in ons model ook een ontsteking in de lever op gaat treden, net als bij de mens. Door de ontwikkeling van nieuwe vaccins en het testen in varkens is de verwachting dat zowel vaccins voor de mens als ook voor varkens kunnen worden getest. Tevens kunnen op grond van grote overeenkomstigheden in de immunologische afweer en in andere orgaanfuncties tussen mens en varken nieuwe behandelingen tegen HEV infecties bij de mens worden getest.



**VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT**

|  |     |
|--|-----|
| Project geselecteerd voor BA?                                | nee |
| Termijn voor BA  |     |
| <b>Reden voor de beoordeling achteraf</b>                    |     |
| Bevat ernstige procedures                                    |     |
| Maakt gebruik van niet-menselijke primaten                   |     |
| Andere reden   |     |
| Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf |     |

**AANVULLENDE VELDEN**

|   |  |
|---|--|
| Nationaal veld 1<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>          |  |
| Nationaal veld 2<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>          |  |
| Nationaal veld 3<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>          |  |
| Nationaal veld 4<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>          |  |
| Nationaal veld 5<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>          |  |
| Startdatum project<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>        |  |
| Einddatum project<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>         |  |
| Goedkeuringsdatum project<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i> |  |
| ICD-code 1<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>                |  |
| ICD-code 2<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>                |  |
| ICD-code 3<br><i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>                |  |
| Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem      |  |



# Advies aan CCD

**B**

Datum 01 oktober 2021  
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202114785

Instelling: 5.1 lid2h  
Onderzoeker: 5.1 lid2e  
Project: Development of a Hepatis E genotype 3 animal model and use in vaccine and treatment  
Aanvraagnummer: AVD202114785  
Betreft: Nieuwe aanvraag  
Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek

## 1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

|               |   |
|---------------|---|
| <b>Proces</b> | <p>5.2 lid1</p> <p>n:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- U geeft aan dat u het diermodel voor 2 doelen wilt gebruiken: enerzijds het ontwikkelen van humane vaccins voor mensen met een verhoogd risico op HEV 3 besmetting en anderzijds het ontwikkelen van vaccins voor gebruik in varkens teneinde vlees te produceren dat gegarandeerd vrij is van HEV 3. De CCD vindt de eerste doelstelling realistisch maar heeft twijfels bij de tweede. Om infectie bij mensen zoveel mogelijk te voorkomen zou de hele veestapel gevaccineerd moeten worden. De CCD weet niet in hoeverre dit in werkelijkheid ook zou gebeuren. De varkens zelf hebben immers geen last van een infectie en de humane doelgroep is klein. Kunt u toelichten waarom u toch denkt dat dit kans van slagen heeft?</li><li>- U geeft in het projectvoorstel getallen weer over het voorkomen van HEV 3 in Europa en Nederland. Kunt u ook iets zeggen over het aantal sterfgevallen, wereldwijd en in Nederland specifiek, gelinkt aan HEV 3?</li><li>- Bij de bijlagen, onder A, beschrijft u niet hoe lang de experimenten maximaal duren voor de varkens. Kunt u dit nog aangeven? Dit is voor de CCD nodig om een goede inschatting van het ongerief te kunnen maken.</li><li>- Bij de bijlagen, vraag B geeft u niet aan of u varkens van beide geslachten gebruikt of van één geslacht. Kunt u dit nog aanvullen? Bij het gebruik van één geslacht graag ook een onderbouwing geven waarom dit</li></ul> |
|---------------|---|

nodig is om de doelstellingen te behalen.

- Kunt u bij de bijlagen, onder vraag D dieper ingaan op vervanging? U geeft aan dat u alternatieven heeft onderzocht en dat deze niet haalbaar waren. Kunt u toevoegen welke alternatieven er beschikbaar zijn en waarom deze niet kunnen bijdragen aan het behalen van de doelstellingen van dit project?

- Bij de bijlagen, vraag D, onder verfijning geeft u een motivering voor de keuze voor het diermodel. Kunt u hier ook ingaan op de translationele waarde naar de mens voor het ontwikkelen van vaccins voor patiënten? En kunt u hier ook ingaan op de onnatuurlijke wijze van infectie?

- Bij de bijlagen, vraag D staat de vraag: "Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment." U gaat hier niet in op de maatregelen die u neemt om het lijden van de dieren zoveel mogelijk te vermijden. Kunt u dit alsnog doen?

- Bij vraag J geeft u algemene humane eindpunten. Kunt u ook humane eindpunten formuleren die specifiek bij deze infectie zouden kunnen passen? U geeft aan dat de dieren maximaal matig ongerief zullen ondergaan, de humane eindpunten moeten zo gekozen zijn dat ernstig ongerief wordt uitgesloten.

- Ook geeft u bij vraag J van de bijlagen aan dat u niet verwacht dat de varkens ernstig ziek worden door de route van infectie. Toch geeft u daaronder aan dat verwacht wordt dat bij 25% een humaan eindpunt zal worden toegepast (10% in bijlage 2). Hoe komt u aan zo'n hoog percentage als u niet verwacht dat de dieren ernstig ziek worden?

- U heeft als beoogde startdatum 01-02-2021 ingevuld, terwijl uw aanvraag pas in april door ons ontvangen is. Wilt u de looptijd van uw aanvraag nog wijzigen? U hoeft ons daarvoor geen nieuw aanvraagformulier te sturen, een antwoord op deze vraag volstaat.

Vragen NTS:

- Het wordt uit de NTS niet duidelijk hoe groot het probleem van HEV type 3 is. De 300.000 doden en miljoenen infecties wereldwijd worden voornamelijk door andere types veroorzaakt. Kunt u cijfers geven hoeveel besmettingen en doden er door HEV type 3 veroorzaakt worden?

- Het doel van de NTS is om het publiek te informeren over projecten waarvoor een vergunning is verleend. Daarom is de NTS in het

|   | <p>Nederlands met een voor een breed publiek begrijpelijk taalgebruik. U gebruikt enkele moeilijke termen in de NTS, zoals faeces, intraveneuze en intrahepatische toediening, complexere cel systemen en pathologische veranderingen. Kunt u in de nieuwe versie van de NTS eenvoudiger taal gebruiken of moeilijke termen uitleggen?</p> <p>- Kunt u de secties over de 3V's aanvullen? Er is onvoldoende inzicht in waarom er dierproeven nodig zijn, waarom er niet met minder dieren gewerkt kan worden en waarom dit de meest verfijnde opzet is.</p> <p>- Kunt u onder "expected impacts/adverse effects" nog toevoegen dat de dieren gedood worden in het kader van de proef?</p> |                  |               |   |
|---|---|------------------|---------------|---|
| Naam proef  | Diersoort   | Stam             | Aantal dieren | Herkomst  |
| <b>3.4.4.1. Development of a HEV E disease model</b>  |   |                  |               |   |
|   | Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )  | SPF vrije dieren | 64            | <b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b> |
| <b>3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies</b> |   |                  |               |   |
|   | Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )  | SPF vrije dieren | 240           | <b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b> |

### Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

#### 3.4.4.1. Development of a HEV E disease model

Citaat: Pigs will be kept in HEPA filtered pens with straw covered solid floors, pen environment is enriched with changing playing materials

#### 3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies

Citaat: Pigs will be kept in HEPA filtered pens with straw covered solid floors, pen environment is enriched with changing playing materials

## Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

### 3.4.4.1. Development of a HEV E disease model

Varkens (*Sus scrofa domestica*) Dit is niet beschreven in de aanvraag

### 3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies

Varkens (*Sus scrofa domestica*) Zie 3.4.4.1.

|  |   |
|--|---|
| <b>Locatie uitvoering experimenten</b> | - Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder.<br>- De volgende problemen met de vergunninghouder zijn bekend: Bij inspectie door de NVWA is gebleken dat deze instelling een melding heeft gedaan van een aanpassing, welke als wijziging ingediend had moeten worden. Daarnaast heeft de instelling een aanpassing niet gemeld. |
| <b>Maatschappij</b>                    | Er wordt verwacht dat het onderwerp in die mate politiek of maatschappelijk gevoelig is, dat eventuele extra communicatie uitingen nodig zijn. Het gaat om een vaccin tegen HEV 3, dat voornamelijk veroorzaakt wordt door het eten van rauw varkensvlees. Infecties zouden dus ook voorkomen kunnen worden door geen rauw varkensvlees te eten.            |

## 2 DEC advies

|                   |   |
|-------------------|---|
| <b>DEC-advies</b> | <p>Citaten uit het DEC advies:</p> <p>A9 (vraag van DEC aan onderzoeker): Zullen varkenshouders wel bereid zijn om hun dieren te vaccineren tegen iets waar ze geen "last" van hebben?<br/>Antwoord: Er zijn wel farmaceuten bezig met het ontwikkelen van HEV3-vaccins maar dat die nog geen model hebben. Het gaat dan met name om vraag vanuit de humane gezondheid; daar is behoefte aan een vaccin. De onderzoeker is door een Deense en een Amerikaanse groep benaderd als modelleur om kennis te delen, een model te maken en de andere onderzoeksgroepen te ondersteunen.</p> <p>C8 (proefopzet): Ervaringen met HEV4 maken het slagen van de ontwikkeling van dit diermodel mogelijk. Het HEV4 model is echter nog niet in immuungecompromitteerde mensen getest. Het is dus onzeker of het HEV3 model voor deze doelgroep geschikt zal zijn.</p> <p>C9 (bijzondere categorieën): Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:<br/><input type="checkbox"/> Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn); de dieren zijn uit</p> |
|-------------------|---|

de commerciële houderij afkomstig.  
De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd.

C10 (huisvesting): De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU voor zover ze niet met HEV3 zijn besmet. Na besmetting moeten de dieren in een High Containment Unit gehuisvest worden waar, om technische redenen, niet volledig aan de eisen voor bedding kan worden voldaan.

C13 (HEP's): HEP's worden niet verwacht omdat een HEV3 infectie bij varkens doorgaans geen verschijnselen geeft. Echter, HEP's worden ook niet uitgesloten, omdat men met meer infectieus materiaal gaat werken en zijn om die reden toch geformuleerd en zullen steeds met de IvD worden besproken. De HEP's zijn in de ogen van de DEC voldoende omschreven.

C18 (geslachten): Er wordt niet aangegeven dat de dieren niet van beide geslachten in gelijke mate worden ingezet in de proeven.

Ethische afweging van de DEC:

1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt het ontwikkelen, en daarna toepassen, van een ziektemodel in varkens voor het testen van nieuwe vaccins en antivirale middelen tegen ziekte door HEV3 het maximaal matig ongerief van maximaal 304 varkens?

2. De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De meerderheid van de DEC heeft in haar afweging meegewogen dat, wanneer het project zijn uiteindelijke doel haalt dit de gezondheid van mensen en varkens (one health principe/zoönose) kan ondersteunen bij een veel voorkomende subklinische infectie bij varkens. De meerderheid (6 leden) van de DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade-baten-analyse:

- HEV3 infectie heeft bij gezonde volwassenen in de meeste gevallen een zelf-limiterend verloop. Mensen met een immuunziekte of een door medicijnen onderdrukt immuunsysteem kunnen na infectie een chronische hepatitis ontwikkelen. Vooral zij hebben een groot gezondheidsbelang met grote morele waarde wanneer er vaccins of therapeutische middelen beschikbaar zijn voor deze aandoening.
- In de varkenshouderij zijn er het risico van besmetting van mensen (zoönose, volksgezondheidsbelang) en een economisch belang. Het gezondheidsbelang waardeert de DEC als een groot belang van reële morele waarde. Het economische belang is ook een groot belang, maar dit waardeert de DEC als van beperkte morele waarde.

- De farmaceutische industrie heeft een economisch belang van beperkte morele waarde.
- De onderzoeker heeft een reëel wetenschappelijk belang (kennis vergaren) dat de DEC waardeert als een belang van reële morele waarde.
- De CRO heeft, omdat dit contract-research-onderzoek betreft, een economisch belang dat de DEC als een gering belang waardeert.
- De varkens in de houderij (doeldieren) worden niet ziek maar moeten mogelijk wel gevaccineerd gaan worden. De DEC waardeert dit als zeer klein negatief belang/geen belang van beperkte morele waarde.
- De proefdieren ervaren naar verwachting maximaal matig ongerief als gevolg van de handelingen en behandelingen in het project. De integriteit van de proefdieren in dit project wordt niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef. Het betreft grote aantallen proefdieren en de DEC waardeert het belang van de proefdieren als een groot belang van grote morele waarde.

3. Op basis van bovenstaande overwegingen zijn 6 leden van de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar het ontwikkelen en toepassen van een ziektemodel in varkens t.b.v. vaccins en therapeutische middelen tegen HEV3-infecties met maximaal matig ongerief voor maximaal 304 dieren, mits het ziektemodel in de praktijk ook veelvuldig zal worden gebruikt voor het toetsen van vaccins en antivirale middelen tegen HEV3. In zijn antwoorden heeft de onderzoeker aangegeven dat er een farmaceut heeft aangegeven een model te willen gebruiken, dat er nu niet is; de meerderheid van de DEC vindt dat voldoende onderbouwing voor de rechtvaardiging van het project. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag.

De centrale morele vraag kan voor 6 leden van de DEC met "ja" beantwoord worden.

2 leden van de DEC hebben zich van stemming onthouden.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

2 leden van de DEC hebben zich van stemming onthouden. Het is het Secretariaat niet duidelijk of dit is vanwege belangenverstrengeling of omdat ze het met het besluit niet eens waren.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

|  |   |
|--|---|
|  | <p>Bij één van de DEC-leden bestond twijfel over de vraag of farmaceutische bedrijven bereid zullen zijn een vaccin te ontwikkelen dat is bedoeld voor immuungecompromitteerde patiënten. Het gaat om een kwetsbare groep van relatief beperkte omvang die in het algemeen weinig of geen antistoffen aanmaakt na vaccinatie. En er zijn ook andere manieren om deze specifieke groep patiënten te beschermen tegen HEV3, o.a. door geen rauw varkensvlees te eten of niet in aanraking te komen met materialen die besmet zijn met rauw varkensvlees. Hetzelfde geldt voor antivirale medicijnen. Dan zou het infectiemodel ongebruikt op de plank kunnen blijven liggen. Dit DEC-lid heeft ook twijfels of veehouders zouden gaan vaccineren (kostenpost) tegen een infectie waar de varkens zelf geen last van hebben.</p> |
|--|---|

### 3 Kwaliteit DEC advies

| Kwaliteit DEC-advies |   |
|----------------------|---|
|                      | <p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de onderwerpen waar de DEC vragen over heeft gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelvingsvragen verstrekt u over het algemeen een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>U geeft aan dat twee leden van de DEC zich van stemming hebben onthouden. In het vervolg ziet de CCD graag terug wat hiervan de reden is.</p> <p>U geeft bij vraag C10 aan dat de huisvesting niet volgens de richtlijn is. In het vervolg ziet de CCD graag van de DEC of zij de reden hiervoor voldoende onderbouwd acht.</p> <p>U heeft de aanvrager vragen gesteld over de humane eindpunten, die in principe niet verwacht worden maar ook niet kunnen worden uitgesloten. De aanvrager geeft echter in bijlage 1 dat maximaal 25% van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken. Onder C13 heeft u dit hoge percentage niet vermeld. Het zou de CCD hebben geholpen in de beoordeling wanneer u had aangegeven of dit percentage realistisch is ingeschat of niet.</p> |



#### 4 Inhoudelijke beoordeling

|   |  |
|---|--|
| <p><b>Doelstelling</b><br/>Doelstelling</p>   | <p>- To establish an animal model in pigs for HEV infections using infectious copies from HEV strains</p> <p>- to evaluate vaccines for humans and pigs (to be used in the current research project and in CRO projects)</p> <p>- to evaluate antivirals and therapeutics against HEV infection (to be used in CRO projects)</p> <p>These direct objectives will contribute to the development of strategies for the prevention and treatment of HEV3 infections in humans and to reduce the zoonotic risk by transmission from pigs to humans.</p>  |
| <p>Wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>   | <p>Even though some in vivo or in vitro models have been established for HEV there is a need for an animal experimental model that can reliably reproduce human disease using controlled exposure.</p> <p>There is no treatment available to control acute HEV, although monotherapy with ribavairin seems to elicit an efficient response in chronic HEV patients infected during organ transplantation. There are currently (outside China) no vaccines approved to control HEV, albeit some have been tested in clinical trials but their safety and efficacy needs further studies. Therefore, there is an unmet need for the identification of efficient vaccine candidates to HEV.</p> <p>The research will contribute to the one-health approach to control HEV in pigs in order to minimize the proportion of pigs carrying HEV at the time of slaughter as requested in a recent EFSA biohazard report [[16].</p> |
| <p>Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>                                  | <p><b>5.2 lid1</b></p> <p>Wat mist is de grootte van het probleem en de verwachte opbrengsten, welke nu slecht zijn in te schatten.</p>  |
| <p><b>Wetenschappelijke kwaliteit</b><br/>Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p> | <p>Citaat C7 uit het DEC advies: De onderzoekers hebben technische kennis en ervaring op dit gebied en werken samen met internationale onderzoekers die veel ervaring hebben in dit werkveld.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvrager of het onderzoek.</p>  |

### 3V's

|             |   |
|-------------|---|
| Vervanging  |   |
|             | <b>3.4.4.1. Development of a HEV E disease model:</b> Citaat: The use of in-vitro or other animal-free experimental methods to achieve a model to study the complexity of HEV infections, which enables to study pathogenesis and vaccine efficacy was evaluated, but considered to be not feasible and also not sufficient informative.  |
|             | <b>3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies:</b> Citaat: The use of in-vitro or other animal-free experimental methods to achieve information on the immunogenicity of vaccines and the efficacy of vaccines or antivirals/drugs in the complexity of a HEV infections was evaluated, but considered to be not feasible and also not informative.   |
| Verminderen |   |
|             | <b>3.4.4.1. Development of a HEV E disease model:</b> Citaat: A literature research on animal models for studies on HEV infection was performed in PubMed and Scopus and revealed that an approach as used here, has been used for HEV 4; In the exploratory phase, the number of animals to be used is reduced to the minimum, which provides sufficient information in regard to virus proliferation and host response to the infection. The results of this exploratory phase will determine the numbers of animals for the consecutive studies to be able to achieve meaningful results. The decision of the number of animals and the reasons for this decisions will be discussed in the respective experimental plan and with the IvD. |
|             | <b>3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies:</b> Citaat: A literature research on animal models for studies on HEV infection and vaccination was performed in PubMed and Scopus and used for the development of the animal model.<br>The results of this development phase determines the numbers of animals for the consecutive studies to be able to achieve meaningful results. The decision of the number of animals and the reasons for this decisions will be discussed in the respective experimental plan and with the IvD.   |

|           |   |
|-----------|---|
| Verfijnen |   |
|           | <p><b>3.4.4.1. Development of a HEV E disease model:</b> Citaat: A few animal models for HEV are described in various species, e.g. in non-human primates, rabbits, mouse, rats, and pigs. We chose to develop the animal model in the pig species, because the species is susceptible for (asymptomatic) infection, thus a natural host, and can be used for biomedical research as well as for target animal research (veterinary vaccines). The analytical tool box for pigs like tools for immunological investigations or gene expression studies in infected tissues are well developed in this species.</p> <p>No adverse effects on the environment are expected and all studies with infectious cDNA clones will be performed in DM-III conditions as stated in the GMO permission GGO IG 20-076.</p>          |
|           | <p><b>3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies:</b> Citaat: A few animal models for HEV are described in various species, e.g. in non-human primates, rabbits, mouse, rats, and pigs. We chose to develop and use the animal model in the pig species, because the species is susceptible for (asymptomatic) infection, thus a natural host, and can be used for biomedical research as well as for target animal research (veterinary vaccines). The analytical tool box for pigs like tools for immunological investigations or gene expression studies in infected tissues are well developed in this species.</p> <p>No adverse effects on the environment are expected and all studies with infectious cDNA clones will be performed in DM-III conditions as stated in the GMO permission GGO IG 20-076.</p> |

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>Hergebruik</b> | Er is geen sprake van hergebruik van dieren. |
|-------------------|--|

| <b>Naam proef</b>                              | <b>Worden de dieren gedood?</b> | <b>Doden volgens richtlijn?</b> |
|--|---------------------------------|---------------------------------|
| 3.4.4.1. Development of a HEV E disease model  | Ja                              | volgens de richtlijn.           |
| 3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies | Ja                              | volgens de richtlijn.           |

|   |   |  |
|---|---|--|
| <b>Naam proef</b>                                     |   |  |
| <b>3.4.4.1. Development of a HEV E disease model</b>  | HEP: 25% (estimation without evidence)  | <p>Citaat: The intention of the procedure is to induce an infection, which leads to hepatitis. Acute severe hepatitis can result in pain due to liver swelling and liver inflammation. Pigs are known to be susceptible to HEV infections, but usually manifest only mild signs of hepatitis without any clinical disease signs; we expect that the induced hepatitis will result in signs of hepatitis confirmed by clinical chemistry and pathology, but do not expect severe clinical disease. As, currently we can only speculate on the severity of disease, the following humane endpoints are defined:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Recumbent at two successive observation moments within 12 hours</li> <li>- No feed intake for 24 hours</li> <li>- Weight loss compared to inoculation time point of more than 15% (corrected for age dependent growth curve)</li> </ul> <p>HEP's will be adapted and discussed with IvD, based on the growing experiences in the project.</p> |
| Varkens (Sus scrofa domesticus)                       | Ongerief: 100,0% Matig  |  |
| <b>3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies</b> | HEP: Citaat: 10% (estimation without evidence as currently no figures are available; we also take in account that vaccination/treatment is to a certain degree effective) | Zie 3.4.4.1.   |
| Varkens (Sus scrofa domesticus)                       | Ongerief: 100,0% Matig  |  |

## 5 Samenvatting

### 5.2 lid1



De dieren worden niet volledig volgens de richtlijn gehouden. Na infectie worden de dieren in HEPA gefilterde units gehouden met aangepaste bedding. De DEC heeft hier geen waarde oordeel over gegeven. **5.2 lid1**

De aanvrager heeft niet aangegeven of dieren van beide geslachten worden gebruikt, indien de CCD nog vragen wil stellen stelt het Secretariaat voor dit nog na te vragen.

De aanvrager geeft aan niet te verwachten dat de dieren ernstige ziekteverschijnselen ontwikkelen maar geeft wel aan dat bij maximaal 25% van de dieren een HEP zal worden toegepast (10% in bijlage 2). Indien de CCD nog vragen wil stellen stelt het Secretariaat voor de aanvrager te vragen dit verder te onderbouwen.

**5.2 lid1** Enerzijds is HEV 3 een infectie die in groeiende mate voorkomt in Europa, met in Nederland 160-300 gedocumenteerde gevallen per jaar. Het betreft voornamelijk mensen met een verzwakt immuunsysteem. Anderzijds kan een infectie ook voorkomen worden door rauw varkensvlees te vermijden, er is dus als het ware een alternatief. Daarnaast is het niet duidelijk of een mogelijk vaccin voldoende werkzaam zou zijn bij mensen met een verzwakt immuunsysteem of dat varkenshouders hun varkens zouden vaccineren tegen een virus waar de dieren zelf geen last van hebben, om een kleine groep mensen te beschermen. Deze punten maken dat de opbrengsten onzeker zijn. De DEC heeft deze dilemma's ook aangekaart in haar advies, maar heeft wel geadviseerd de aanvraag te vergunnen.

**5.2 lid1**

## **6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

**5.2 lid1**

## 5.2 lid1

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

## 7 Concept beschikking voor akkoord CCD

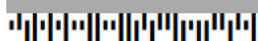


> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h



**Centrale Commissie**

**Dierproeven**

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0800 7890789

info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD 5.1 lid2h 202114785

**Bijlagen**

3

Datum 1 oktober 2021

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 5.1 lid2e,

Op 6 april 2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Development of a Hepatitis E genotype 3 animal model and use in vaccine and treatment" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202114785. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 1 november 2021 tot en met 31 oktober 2026.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

**Procedure**

*Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij 5.1 lid2h

(hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 19 augustus 2021.

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

### *Nadere vragen aanvrager*

Op 13 september 2021 en 24 september 2021 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op incidentiecijfers HEV 3, toelichten van de haalbaarheid van de studie, aanvullen 3V's, motiveren diermodel, beargumenteren verwachte hoge uitval en enkele zaken in de NTS. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

**Datum:**

1 oktober 2021

**Aanvraagnummer:**

AVD 5.1 lid2n 202114785

### **Overwegingen**

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

### **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 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. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.



**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

**Datum:**

1 oktober 2021

**Aanvraagnummer:**AVD **5.1 lid2h** 202114785

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

## 5.1 lid2h

drs. F. Braunstahl  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



# Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 november 2021 tot en met 31 oktober 2026, voor het project "Development of a Hepatis E genotype 3 animal model and use in vaccine and treatment" met aanvraagnummer AVD<sup>5.1 lid2h</sup>202114785, na advies van <sup>5.1 lid2h</sup>

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is onderzoeker. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 6 april 2021
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 21 september 2021;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.4.1. Development of a HEV E disease model, zoals ontvangen op 21 september 2021;
    - 3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies, zoals ontvangen op 21 september 2021;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 29 september 2021;
  - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 19 augustus 2021
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 21 september 2021, 29 september 2021.

| Naam proef  | Diersoort/ Stam                                       | Aantal dieren | Ongerief     |
|---|---|---------------|--------------|
| <b>3.4.4.1. Development of a HEV E disease model</b>  |   |               |              |
|   | Varkens (Sus scrofa domesticus)<br>/ SPF vrije dieren | 64            | 100,0% Matig |
| <b>3.4.4.2. HEV vaccination and treatment studies</b> |   |               |              |
|   | Varkens (Sus scrofa domesticus)<br>/ SPF vrije dieren | 240           | 100,0% Matig |

### Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid 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.

**Aanvraagnummer:** AVD<sup>5.1 lid2h</sup> 202114785

- 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:**

AVD<sup>5.1 lid2n</sup> 202114785

## 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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd

**Aanvraagnummer:**AVD 5.1 lid2f 202114785

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

**Einde van een dierproef**

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

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

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

In artikel 13d van de wet 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.

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** vrijdag 8 oktober 2021 11:59  
**Aan:** 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202114785

Geachte 5.1 lid2h ,

Op 06-04-2021 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Development of a Hepatis E genotype 3 animal model and use in vaccine and treatment' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202114785.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op incidentiecijfers HEV 3, toelichten van de haalbaarheid van de studie, aanvullen 3V's, motiveren diermodel, beargumenteren verwachte hoge uitval en enkele zaken in de NTS.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 1-10-2021.

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de onderwerpen waar de DEC vragen over heeft gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelvragen verstrekt u over het algemeen een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

De CCD moet wel zeggen dat zij in eerste instantie moeite had met deze aanvraag en nog veel vragen heeft gesteld om meer helderheid te krijgen over onder andere de proefopzet, de haalbaarheid van de studie en de 3V's.

U geeft aan dat twee leden van de DEC zich van stemming hebben onthouden. In het vervolg ziet de CCD graag terug wat hiervan de reden is.

U geeft bij vraag C10 aan dat de huisvesting niet volgens de richtlijn is. In het vervolg ziet de CCD graag van de DEC of zij de reden hiervoor voldoende onderbouwd acht.

U heeft de aanvrager vragen gesteld over de humane eindpunten, die in principe niet verwacht worden maar ook niet kunnen worden uitgesloten. De aanvrager geeft echter in bijlage 1 dat maximaal 25% van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken. Onder C13 heeft u dit hoge percentage niet vermeld. Het zou de CCD hebben geholpen in de beoordeling wanneer u had aangegeven of dit percentage realistisch is ingeschat of niet.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
 Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
 Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
 .....

T: 0900 2800028  
E: info@zbo-ccd.nl