

Inventaris Wob-verzoek W16-12S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2015356</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x		x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
7	DEC-advies				x		x		
8	Ontvangstbevestiging				x		x		
9	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
10	Reactie verzoek aanvulling				x		x		
11	Advies CCD		x						x
12	Beschikking en vergunning				x		x		
13	Mail beschikking 22-2-2016				x		x		
14	Mail terugkoppeling DEC 23-2-2016				x		x		

22 DEC 2015



Centrale Commissie Dierproeven

AVD 40100 2015 356

## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in   40100 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1"><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td colspan="2">Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td colspan="2">[Redacted]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>9098104</td><td></td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]		KvK-nummer	9098104							
Naam instelling of organisatie	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]																
KvK-nummer	9098104																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1"><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Akkermaalsbos</td><td>12</td></tr><tr><td>Postbus</td><td colspan="2">59</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6708 AB</td><td>Wageningen</td></tr><tr><td>IBAN</td><td colspan="2">NL10 RABO 0397066465</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td colspan="2">Wageningen UR</td></tr></table>	Straat en huisnummer	Akkermaalsbos	12	Postbus	59		Postcode en plaats	6708 AB	Wageningen	IBAN	NL10 RABO 0397066465		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR	
Straat en huisnummer	Akkermaalsbos	12															
Postbus	59																
Postcode en plaats	6708 AB	Wageningen															
IBAN	NL10 RABO 0397066465																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[Redacted]																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[Redacted]																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |                |
|------------|----------------|
| Startdatum | 1 - 3 - 2016   |
| Einddatum  | 31 - 12 - 2019 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Improvement of Animal Health and Production by Innovative Vaccination Strategies
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Verbetering van Gezondheid en Productie in Veehouderij door Optimale Vaccinatie
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |  |
|-------------|--|
| Naam DEC    | DEC Wageningen UR                        |
| Postadres   | Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen |
| E-mailadres | dec@wur.nl                               |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,- Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

- Melding Machtiging
- bestelorder WUR 921840

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

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

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

Naam

Functie

Plaats

Wageningen

Datum

21 - 12 - 2015

Handtekening





## Form Project proposal

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

### 1 General information

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

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

#### General information

Vaccination still belongs to the most effective prevention strategies to control endemic pathogens, which are responsible for major losses in farm animals ([www.discontools.eu](http://www.discontools.eu)). In this way vaccination

contributes to improved animal welfare and the reduction of the use of medication (e.g. antibiotics and anti-parasitic medication) on farm. However, although vaccines are available for a number of endemic farm animal diseases, the efficacy of vaccines is often limited. This can be due to several factors. Responsible pathogens can continuously evolve new antigenic profiles as in *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus* (PRRSV), which differ from the antigen used in the vaccines. Or, a vaccine has a limited efficacy spectrum as in *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo) vaccines, which only protect against disease and not against infection/transmission. Or the production method of the current vaccine is costly and new vaccines with a broader range of protection and an improved production process is required as in *Eimeria* vaccines.

The project group of the institute (PG) is partner in the recently started EU programme which aims:

- a) to demonstrate the efficacy, safety and cost-effectiveness of promising pre-clinical vaccine candidates against a selection of endemic pathogens (PRRSV, M.hyo, Clostridia, *Eimeria*, *Bovine Respiratory and Syncytial virus* (BRRSV), *Mycoplasma bovis*),
- b) to design generic innovative vaccine strategies by the investigation on mechanisms of immune protection,
- c) to gain knowledge on immune evasion mechanisms and to analyse immunity and immune mechanisms associated with the perinatal period of farm animals,
- d) to explore new vaccine concepts based on subunit vaccines, DNA vaccines, DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) vaccines or new adjuvant-vaccine combinations and new developed administration devices like e.g. transcutaneous patch vaccination.

The EU programme is composed of 22 International partners from academia, research institutes and industry and as usual in this consortia, research is a common activity subdivided over a range of work packages. Animal studies will be performed at different partner institutes and materials from animal studies will be shared between institutes as much as possible. Research strategies as well as animal study designs and results are regularly discussed within the consortium group during the (bi-) annual meetings, but also on a more frequent basis during work package meetings and inter-collegial exchanges.

In this project proposal for the approval of the animal studies performed in the Netherlands we will focus on the studies which will be conducted at our institute in the PG on behalf of the EU-project consortium.

### **The PG in the EU programme**

The PG is involved in five different work packages of this programme and in our animal studies we will focus on:

- a) testing promising pre-clinical vaccine candidates against PRRSV and M.hyo in pigs and *Eimeria* in chickens with regard to efficacy and immune responses (new vaccine candidates)
- b) comparative studies on the immune response in the perinatal period in piglets and chickens for a better understanding of age-related vaccine responses and possibly new vaccine strategies in the new born (neonatal immunity)
- c) the optimization of a new skin delivery system and new adjuvant combinations in pigs and oral and spray vaccination in chickens (vaccine delivery routes and adjuvants)

These three foci will contribute to development of more effective vaccination strategies.

In the following we will provide summarizing background information for each of the three research foci of the experiments performed in the PG as part of the EU programme.

#### Focus a): New vaccine candidates

**PRRSV** is the first most damaging infectious pig disease worldwide with abortion problems and serious respiratory problems in nursery and finishing pig units by either direct effects on the lungs and immune system and by favouring secondary infections by other respiratory pathogens. PRRS virus is a RNA virus with two major genotypes, i.e. a PRRSV type I, the European type and a PRRSV type II, the North-American type. Both types differ significantly from each other in virulence as well as in pathogenicity. Within the EU type virus, there are also considerable differences and therefore at least three subtypes are identified on the basis of the genetics and within and between subtypes differences in pathology can occur. PRRSV is poorly immunogenic (Vaccine, 27: 3704), induces a limited antibody response that is i) non protective at early time points and ii) weakly neutralizing at late time points. The T cell arm of anti-

PRRSV immunity, especially the CD8+ T cell cytotoxic response, has been under-investigated.

New vaccine candidates are based on recent identified subtypes of the EU type and next to efficacy of these vaccines, the project focusses on the combination of the vaccines with new adjuvant-combinations, which are directed towards several Toll like receptors (TLR) on antigen presenting cells (APC) and are used to promote the immunogenicity of antigens in vaccines. Our institute and especially the PG has a long standing experience in research in PRRSV virology and host immunity (Vet Microbiol 163 : 1). The developed expertise and animal models are used for vaccine evaluation and also comparative studies on virulence and pathogenicity of various strains and immunology of the host.

**M. hyo** is the main player in the respiratory disease complex of pigs and current vaccines are moderately able to prevent clinical disease, but do not interfere with the infection process and do not stop the transmission process in a pig herd. New vaccine candidates will be identified by partners within the EU programme and immunogenicity and efficacy will be tested with or without combination with PRRSV vaccines in the PG.

**Eimeria** spp. are intestinal parasites, which are responsible for enteric coccidiosis in chicken. This disease has a severe course in young chicken and prevention requires either vaccination with a costly live vaccine or an extensive chemoprophylaxis. The immune mechanisms of protection against *Eimeria* are not known and may involve Natural Killer (NK) cells, Th1/Th17 and detrimental Regulatory T (Treg) cell responses (J Immunol 173: 2675).

The new developed vaccines will be based on transgenic constructions (J Vaccines Vaccin 2012, 3:5). But next to the vaccine compound are the way of administration to the mucosa (oral or spray) as well as the age of vaccination of interest (in-ovo, post hatching).

#### Focus b): Neonatal immunity

Neonates show major differences with adults regarding their innate and acquired immune responses, both due to interferences of maternal derived antibodies (MDA) and to the maturation development stage of the immune system. Most knowledge in neonatal immunity has been obtained in mice, in which the immature immune system was shown to be biased towards Th2 immunity. In farm animals, young animals present a critical period of sensitivity to pathogens when the MDA decrease beyond protective levels and when self-immunity has not yet been triggered by vaccination. To reduce this gap of immunity, vaccine strategies that include the use of adequate adjuvants and optimal delivery systems need to be developed taking into account the specificity of the young age immune system and alleviating the MDA interference. In chickens, foetal in ovo vaccination has been introduced for few vaccines. The advantages of in ovo vaccination are the early onset of immunity in neonatal chickens coupled with the convenience by which a large number of embryos can be vaccinated. It is not known whether *Eimeria* antigens administered in ovo induce mucosal immune responses in the neonatal chicken.

#### Focus c): Vaccine delivery route and adjuvants

**The vaccine route of delivery** can be key for optimal vaccine efficiency. Intranasal (IN) and oral vaccine delivery has shown to direct the immune effectors to mucosa for optimal mucosal defence which is often the first line of defence to pathogens. In chickens, live vaccines are administered by spray or orally but the ability of these routes to reciprocally induce lung and intestinal immunity is not known. Transcutaneous (TC) vaccine delivery appears superior to other systemic routes to induce potent B and T cell immunity and sometimes mucosal immunity (Expert Rev Vaccines 7: 1201). New production technologies like immune patches facilitate easy application and mass application, but the functionality and conformation needs to be studied.

The TC advantages have been demonstrated in rodents and non-human primates (Adv Funct Mater 14: 161) but to date, no studies have been published in farm animals. A partner of the EU programme has licensed a novel dissolving microneedle patch technology ('DMN patch') for optimal TC delivery and vaccine stability and they have the know-how to manufacture towards scalable, cost effective and practical use.

**Adjuvants** contain molecules that stimulate antigen presenting cells (APC), for example appropriate combinations of Toll-like receptor ligands (TLR-L), and generally have an excellent capacity to enhance vaccine efficacy. This permits conversion of poorly immunogenic antigen into effective vaccines by adding an adjuvant (TLR-L) resulting in induction of early protection, enhanced duration of immunity, induction of a broader immune response efficacious against antigenic variants, reduction of individual variability to assure better vaccine coverage, and reduction of antigen dose in vaccines making them more economical



(Nature,470: 543). High levels of systemic antibodies may also “spill-over” to mucosal sites and thereby prevent colonisation with the pathogens.

The selective expression of TLR by different APC subsets (J Exp Med 194 : 863) and their reactivity to TLR-L differ among species (Dev Comp Immunol 34 :572) and most likely between different age groups (perinatal vs adult). So further investigation is needed to provide further insights in the use of adjuvants (TLR-L) and their effects on different age groups regarding to enhance vaccine effectivity.

**Especially work in focus B and C will form a substantial part of the research project of a PhD candidate, who will participate full time in this project in the PG. The focus of the PhD candidate will be on neonatal immunity and the possibilities of adjuvants to enhance the vaccine response.**

### 3.2 Purpose

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

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

The general objective of the EU programme is to evaluate and develop promising new vaccine candidates and generate effective vaccination strategies towards the control of endemic pathogens as PRRSV, M. hyo and *Eimeria*. New vaccines for such relevant endemic diseases should lead to improved viability, sustainability and profitability of food animal production systems, improved animal welfare and reduced medication (e.g. antibiotic) usage in farming.

The PG participates in a previous determined part of the project with objectives contributing to the general objective of the EU programme

#### **The research objectives of the institute are:**

##### Focus a): New vaccine candidates

As mentioned before, several international partners are working together on the objectives of the EU programme and one major task of the PG is vaccine efficacy and mainly the initial response testing of new vaccines against PRRSV, M.hyo and *Eimeria* in the target species pig or chicken. The selection of the new vaccine candidates is based on antigenetic profiling or molecular analysis combined with in-vitro and limited in-vivo results which will result in suitable candidates for further vaccination studies.

Due to the expertise of the institute and especially the PG on PRRSV and *Eimeria* (Vet immunol Immunopathol 117: 26) infection models the feasibility to test vaccine efficacy is high. Infection models with M. hyo are frequently described in literature. The PG does not have recent experience with this specific model, but in regard to our experience with respiratory disease models in pigs and close collaboration with other experienced institutes within the EU programme the use of the mycoplasma challenge model is also feasible.

The purpose of the studies is not only to show vaccine efficacy and the protection of the animals against disease or reduction of pathogen load, but also on the determination of the immunological response. The experience of the PG with the respective animal models (PRRSV, *Eimeria*) and the measurement of the relevant immunological response parameters in chicken and pigs (serological parameters, T-cell immunity) make this objective very achievable.

##### Focus b): Neonatal immunity and adjuvants

The mentioned endemic infections/diseases affect young animals, often at a time point, when maternal immunity vanishes and an own immune response is insufficiently developed. A substantial part of the mentioned PhD project is the comparative evaluation of the functionality of APC in piglets and chicken in the perinatal period compared to older animals with a fully developed immune system. Work will address circulating and local APC combined with the presence of TLR and the interplay of APC with other immune cells and adjuvants (TLR-L), generally and in the context of the investigated endemic pathogens and vaccine. The cooperation with highly experienced international groups in APC and TLR expression within the EU programme, the availability of descend screening systems for effectiveness of TLR-L at our institute and the partner institutes within the EU programme and the interaction with and support by renowned partners on pig immunology in Switzerland and chicken immunology in Scotland (both part of

the EU programme) strongly supports the achievability of this project part.

#### Focus c): Vaccine delivery routes

Another main objective that addresses generic vaccine strategies is directed towards the vaccine delivery routes. The immune response after transcutaneous vaccination in pigs will be investigated and compared to other vaccination methods (intra nasal, oral and intramuscular). For chicken the immune response after oral or spray vaccination will be compared to vaccination in ovo with a focus on the mucosal immune response. The specificities of immunity and immune responses during perinatal development in piglets and chickens will be intergraded in this part and shows the strong overlap between focus a) and b). Again the cooperation with expert groups on vaccine formulation and vaccine devices within the EU programme and our own experiences in the PG with the animal infection models as well as with infection studies in young age piglets and chickens make this objective also achievable in respect to the descend performance of the studies.

Summarizing the PG is investigating the optimal age of vaccination together with the optimal vaccination route and the most suitable adjuvant which all together contribute to a more effective initial immune response in target animal pig and chicken. Multiple experiments will be conducted in the PG to achieve these objectives. The experiments are described in more detail under 3.4.2.

---

### **3.3 Relevance**

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

#### Scientific relevance

The EU programme has been designed to “better understand the interaction between the immune system and their specific pathogen” by identifying immune mechanisms of protection and of sensitivity to pathogens to induce the right effectors of immunity towards the best antigens.

Weak immune responses associated with the perinatal stage (in ovo, young age) will be evaluated and mucosal protection will be improved, because most endemic pathogens enter the host via mucosal surfaces.

The EU programme will aim at “fostering an earlier onset of protection and a longer duration of immunity taking into account different developmental stages” by using new adjuvants, vector vaccines, formulations, vaccine combinations and delivery strategies. The PG will contribute by conducting experiments with a focus on neonatal immunity, efficacy of new vaccine candidates and new delivery strategies.

#### Social relevance

The EU programme will develop vaccines and companion tests to enable sero-epidemiological monitoring of disease by distinguishing infected from vaccinated animals (DIVA) for controlling vaccine effectiveness and for eradication programs. Efforts will be made to develop safer vaccines, with control of attenuated vaccines to avoid reversion to virulence and generation of vector vaccines without propagative potential. The EU programme will provide mathematical models for predicting the epidemiological consequences of vaccination, such as vaccine effect on pathogen transmission and risk of pathogen escape.

The development of affordable and cost-effective vaccines will be promoted, including vaccines that can be stored and supplied without the need for cold chains. The previous described research foci of the PG will indirectly contribute to the achievement of this general social objective.

---

### **3.4 Research strategy**

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

#### **General overview of EU programme**

The EU programme is organized in four research pillars (A, B, C and D) and each research pillar is divided in work packages. Besides the research pillars there is one management pillar (F) and one dissemination pillar (E) to ensure adequate project management and communication of achieved results (see figure 1).

Pillar A consist of a socio-economic context analysis of the EU programme diseases and their control measures. Pillar B concerns the development of specific vaccine strategies and candidates. Pillar C is focussing on the development of generic vaccine strategies. Pillar D will develop strategies to translate EU programme research into the market and into the field.

## The PG with the EU programme

The PG participates in pillar B (focus a): New vaccine candidates) and C (Focus b) and c) Neonatal immunity/Vaccine delivery routes and adjuvants).

### Focus A: New vaccine candidates

Development of pathogen-specific vaccine strategies

- Chicken: Eimeria
- Pig: M.hyo and PRRSV

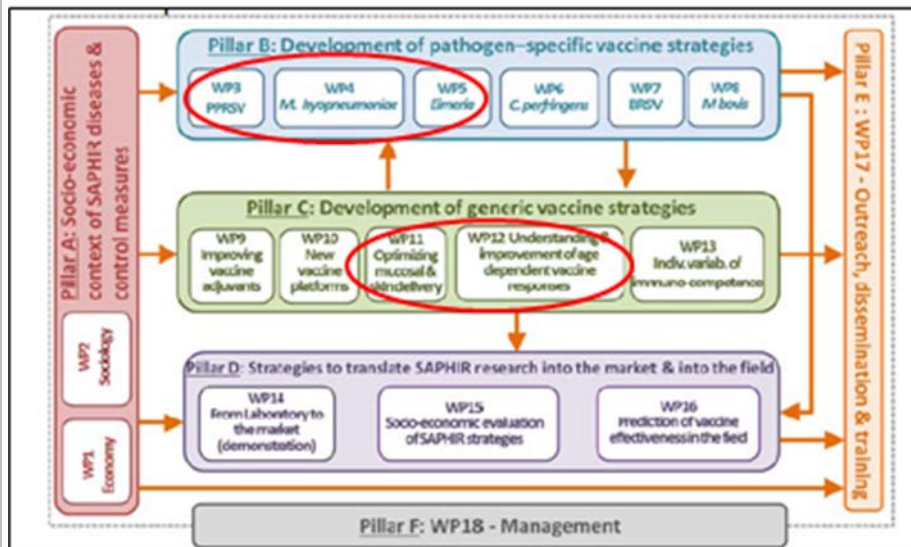
### Focus B: neonatal immunity

Understanding and improvement of age dependent vaccine responses

### Focus C: vaccine delivery routes and adjuvants

Optimizing mucosal and skin delivery

Figure 1: overall design of the EU programme named SAPHIR (Strengthening Animal Production and Health through Immune Response



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 PG will conduct five different projects(tasks) within the EU programme . Each task (described separately below) is part of one of the previously described foci and contains in general one animal experiment (up to 3 experiments per task can be needed to address the specific research question).

### Focus a): New vaccine candidates

#### 1. Efficacy of a new PRRSV vaccine against heterologous challenge with PRRSV

Young PRRSV-negative pigs will be vaccinated with the new PRRSV vaccine via intramuscular (IM) route and challenged with a virulent PRRSV strain. The animal model for PRRSV has been developed and used frequently at the PG. The virus infection usually results in slight increase in body temperature and mild respiratory distress. Clinical observation results, body temperature curves and virus load in blood and tissues as well as histopathological findings in lungs and lymph nodes will be used to determine protective efficacy. After vaccination and challenge antibodies will be quantified longitudinally and blood T cell response will be measured as read out for immunogenicity (see 3.4.4 serial number 2).

2. Measuring the vaccine responses of new M. hyo vaccines

M. hyo free pigs will be vaccinated with the new vaccine candidates, which are selected on basis of in vitro or preliminary immunological response parameters. Efficacy responses upon vaccination with new vaccines and after administration via different administration routes will be assessed during vaccination period and after challenge. M. hyo-specific T cell responses (cytokines and proliferative responses) will be measured. Serum and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid, which will be obtained during vaccination phase and prior to challenge and will be tested for the presence of specific antibodies. The used M. hyo animal infection model will be established together with another partner within the EU project, who has already extensive experience with this model (see 3.4.4 serial number 2).

**Focus b) and c): neonatal immunity, vaccine delivery routes and adjuvants**

3. Responses to TLR ligands of immune cells from pigs of different age classes

From pigs of one week and 12 weeks of age, APC and lymphocytes will be isolated from blood and tissues in order to study TLR dependent immune responses in vitro. The cytokine responses to different adjuvants/TLR -L in will be measured and the best TLR -L (adjuvant) at young age will be selected for transcutaneous vaccine formulations in vivo (see 3.4.4 serial number 1).

4. Induction of mucosal response/ immunity after in ovo vaccine compared to oral and spray vaccine administration directly after hatch in chicken

The mucosal response in the respiratory tract and intestinal tract after in ovo vaccination with Eimeria antigens in comparison with Eimeria live vaccines will be studied in chicken and compared to responses obtained after vaccination directly after hatch by spray or oral route. The B and T-cell responses in the mucosal surface (lung and intestine) will be analysed (Th1, Th2 and CD8+ T ) (see 3.4.4 serial number 3).

5. DMN patches with PRRSV vaccine and protective immunity

The PRRSV vaccine and the selected adjuvants will be formulated with appropriate excipients for stabilization in DMN. Critical quality attributes (antigenicity, biophysical properties) will be checked. Full and partial dose will be fabricated to assess the dose-sparing capacity. Rearing and neonatal pigs will be immunized with adjuvanted and inactivated PRRSV using DMN patches and by intramuscular route. The site of patch administration will be closely monitored for local adverse events after each vaccination and the convenience of use will be evaluated. The magnitude and isotypes of serum and mucosal antibodies and circulating T cell responses will be assessed. The protection against a virulent PRRSV challenge will be measured (see 3.4.4 serial number 2).

---

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.

Activities in the PG in Focus a), b) and c) as part of the EU programme are connected in first instance by the use of the same antigens and the transfer of obtained immunological knowledge in focus b) and c) to the new vaccine formulations in focus a). The progress in the development of the new vaccines will be continuously evaluated by the WP members of the EU programme and the general project management (Pillar F) and specific milestones for all the work packages and animal procedures are described in the EU programme.

The first animal procedure in the PG will involve the comparative research on neonatal immunity in pigs and in chickens (Focus b) in vitro in combination with the different TLR-L. Animal procedures will only be started if the PG has established the necessary immunological assessments, especially in regard to TLR expression analyses and specific cellular immune assays which will be obtained through close collaboration with experienced partners of the EU programme.

If new vaccine candidates or vaccination deliveries in focus b) and c) show no clear statistical powered results in efficacy they will not be selected for further use in vaccination trials.

The final vaccination experiments in focus a) depend on the results of the challenge experiments performed by other partners within the EU programme. Protective efficacy studies in the PG will only be performed if the used animal model offers sufficient statistical powered results in regard to the protection key parameter, i.e. reduction in pathological lesions and pathogen load.

---

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	Blood and tissue sampling for in-vitro studies in pigs
2	M.hyo and PRRSV vaccination studies in pigs with challenge
3	<i>Eimeria</i> vaccination studies in chickens with or without challenge
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100				
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek				
1.3 List the serial number and type of animal procedure.  <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	<table><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Blood and tissue sampling for in vitro studies in pigs</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Blood and tissue sampling for in vitro studies in pigs
Serial number	Type of animal procedure				
1	Blood and tissue sampling for in vitro studies in pigs				

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Neonates show major differences with adults regarding their innate and acquired immune responses, both due to interferences of maternal derived antibodies (MDA) and to the maturation development stage of the immune system. In pigs, young animals present a critical period of sensitivity to pathogens when the MDA decrease beyond protective levels and when self-immunity has not yet been triggered by infection or vaccination. To reduce this gap of immunity, vaccine strategies that include the use of adequate adjuvants and optimal delivery systems need to be developed taking into account the specificity of the young age immune system and alleviating the MDA interference.

Antigen presenting cells (APCs) play a key role in processing and of course presenting antigens to the immune cells in the innate immune response. APCs are primarily at sites, where pathogens can enter the body, like skin, respiratory tract or intestinal tract and in the lymphatic system. For in vitro research purposes APCs are often generated from blood derived monocytes or bone marrow derived monocytes. In vaccines, adjuvants are used to enhance the immune response after vaccination. They often contain molecules that stimulate APC One mechanism can be binding e.g. to a Toll-like receptor (TLR) on a APC which contributes to enhanced vaccine processing and ultimately vaccine efficacy. This permits conversion of poorly immunogenic antigen into effective vaccines by adding an adjuvant with a TLR ligand, which ligates to the TLR on the APC resulting in an induction of early immune response with an enhanced duration and induction of a broader immune response efficacious against antigenic variants.

Pigs of one and 12 week of age will be used to investigate the presence of TLR on APCs in blood and tissues and the efficacy of different TLR-ligands on immunogenicity in neonatal and immunocompetent animals. Blood and tissue will be isolated after euthanasia to study in vitro the TLR dependent immune responses in APC and lymphocytes in order to select the best TLR-ligand (adjuvant) and the age with the

most effective response.

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

Euthanasia of animals to sample blood and tissues to measure parameters and perform in vitro experiments to study the difference in immune response between pigs of one week (neonatal group) and pigs of 12 weeks (immunocompetent group).

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

For the individual studies data from own previous experiments in the project group of the institute (Vet Microbiol 163 : 1). and from literature review were used to estimate the number of animals to be used and the expected differences in the key parameters of the experiment.

Depending on the key parameter necessary group sizes can vary. This results together with the expected relative standard deviation has been used in a statistical computer program (R studio) to calculate the expected number of needed animals for significant study results. Studies will be designed to achieve a power of 0.8 and a significance level of  $P < 0.05$ .

In the course of the project, for each study plan a calculation of the number of the minimal number of animals will be justified on the above mentioned criteria.

#### **B. The animals**

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

Specific pathogen free pigs of a high health breeding farm, male and female

- 20 animals of 1 week old to represent the neonatal group
- 20 animals of 12 weeks old to represent the immunocompetent group

#### **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.

The minimal number of animals will be used to compare expression profiles of APCs in blood and different tissues and to achieve significant results within outbred animals. In the same animals samples from different tissues will be collected and compared. Colleague researchers within the EU programme will be informed about the use of these animals to ensure possible additional use of tissues.

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

The animals will be sedated before euthanasia to minimize pain and fear.

### **Repetition and duplication**

#### **E. Repetition**

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

The described experiment has not previously been performed based on review of published articles.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

The animals will be anaesthetized before euthanasia.

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

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

No other adverse effect will be expected.

Explain why these effects may emerge.

Not applicable

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

Not applicable

### 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.



Indicate the likely incidence.

### **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').

Euthanasia – Mild

## **End of experiment**

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

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The extensive sampling of variable tissues cannot be combined with recovery after the procedure and euthanasia is needed to prevent severe discomfort.

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.		
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.  <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	2	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> (M.hyo) and Porcine Reproductive and Respiratory Virus (PRRSV) vaccination studies in pigs with challenge

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

New pre-clinical vaccine candidates to control M.hyo or PRSSV will be assessed for protective efficacy and immunogenicity. M.hyo and PRSSV are both important endemic respiratory pathogens and responsible for major losses in pig farming. New vaccine candidates, which are developed within an international collaboration (EU programme) are based on new formulations and/or adjuvant combinations. The vaccine aim to achieve a better protection against infection or fostering an earlier onset of protection and a longer duration of immunity taking into account age and different development stages in immunity of the animal.

To address these objectives the animal experiments within the project group of the institute (PG) will focus on improvement of vaccine efficacy compared to existing vaccines or on effect of age at time point of vaccination (neonatal vs adult) and/or on the route of vaccination ( intranasal (IN), intramuscular (IM) and dissolving microneedle patch technology (DMN patch)) to provide an optimal vaccination strategy in combination with the new vaccine candidate. Generally vaccination effects of new vaccine candidates or adjuvants will be compared to non-vaccinated control animals and according to the principal objective of the individual study also dose effects of vaccines and/ or adjuvants can be studied.

During the experiments several procedures (described in the second part of 2A) will be conducted in order to measure parameters (e.g. clinical signs, antibody response, viral excretion, T-cell response and pathologic findings during necropsy) which will evaluate the efficacy of the new vaccine.

Three different projects (studies) on behalf of the following objectives will be conducted in the PG as part of the I EU programme. The studies contain in general one animal experiment, but to address to specific research question more experiments (up to 3) can be needed.

Study 1: Efficacy of a new PRRSV vaccine against heterologous challenge with PRRSV

Young PRRSV-negative pigs will be vaccinated with new PRRSV vaccines via intramuscular (IM) route and challenged with a virulent PRRSV strain. Clinical observation results, body temperature curves and virus load in blood and tissues as well as histopathological findings in lungs and lymph nodes will be used to determine protective efficacy. After vaccination and challenge antibodies will be quantified longitudinally and blood T cell response will be measured as read out for immunogenicity.

Study 2: Measuring the vaccine responses of new M. hyo vaccines

Model developing: In a first step a M. hyo animal model will be established. Recent M. hyo isolates will be selected and studies to define infection dose and infection route will be performed. In one animal experiment with three different challenge doses and two different administration routes the induction of typical histological lung changes will be studied and infection kinetic and location of M. hyo in the lungs determined. Only if this study mode shows statistical powered results in regard to the protection key parameter, i.e. reduction in pathological lesions and pathogen load this model will be used for further vaccine immunogenicity and efficacy studies.

For vaccine immunogenicity and efficacy studied, M. hyo free pigs will be vaccinated with the new vaccine candidates, which are selected on basis of in vitro or preliminary immunological response parameters. Efficacy responses upon vaccination with new vaccines and after administration via different administration routes will be assessed during vaccination period (ca. 6 weeks) and after challenge. M. hyo-specific T cell responses (cytokines and proliferative responses) will be measured. Serum and broncho-alveolar lavage (BAL) fluid, which will be obtained during vaccination phase and prior to challenge, will be tested for the presence of specific antibodies.

Study 3: patches with PRRSV vaccine and protective immunity

Newly developed patches with microneedles will be studied in combination with different adjuvants and PRRSV vaccines on their effects on the systemic and local immune response in new-born piglets and immunocompetent older pigs. Therefore DMN patches will be formulated with appropriate excipients for stabilization in DMN. Initial experiments will be done to compare immune effects and to improve the design of the DMN patches. Therefore, local immune responses in the skin, the regional lymph nodes and the blood will be studied. Later full and partial doses will be fabricated to assess the dose-sparing capacity. About 10 week old pigs and neonatal pigs will be immunized with adjuvant and inactivated PRRSV using DMN patches or by intramuscular route twice at 3 weeks intervals. The site of patch administration will be closely monitored for local adverse events after each vaccination. The magnitude and isotypes of serum and mucosal antibodies and circulating T cell responses will be assessed. The protection against a virulent PRRSV challenge will be measured.

---

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

---

Blood sampling

- Blood will be extracted at various time points in the procedure from the jugular vein in the neck or from the vein in the ear
  - The extracted volume will never exceed 8ml/kg body weight within 2 weeks ( according to Handboek Proefdierkunde, vijfde druk)
  - Repeated blood sampling is needed to evaluate the efficacy of the vaccination at different time points in the experiment;
  - Generally, in the vaccine studies, there will be a minimum of 24h between two consecutive samplings and sampling frequency is depending on the type and duration of the study between 3 and 10 times
  - In the case that a more frequent blood sampling within 24 hours is necessary ear vein catheters will be used. For the introduction and fixation of the catheters pigs will be anaesthetized.
  - In studies which address early immune responses like the study with DMN patches a more frequent sampling on the day of administration will occur; the use of ear vein catheters or direct intravascular blood sampling will also be discussed with the IVD.
-

### Vaccination

- A maximum of three vaccination will be administered to the animals. One initial vaccinations and one or two booster vaccinations. Two vaccinations at one time point will only be applied in the combined M.hyo and PRRSV vaccination trial, followed by a booster vaccination. In different studies, different routes of vaccination will be used and determined according to the objective of the individual study:
- Intramusculair (IM) vaccination: the vaccine will be applied in the muscle in the neck, on the back or in the hind limb. A maximum of 2 ml will be injected in one IM injection place. The injection place will be monitored for adverse events and the booster vaccination will be injected at a different part of the body.
- Oral vaccination: max. 10 ml of vaccine will applied to the oral cavity with fixation of the head and use of stomach catheter and mouth opener
- Intranasal vaccination: max. 3 ml of fluid will be dispended either as droplets or as aerosols in both nasal cavities and the head will be fixated for minimal 15 seconds with the nose in an upward position
- dissolving microneedle patch vaccination: dermal patches (ca. size 4x4 cm) will be attached to the skin.

The vaccination is needed to conduct the experiment

### Challenge with pathogen

- PRRSV: inoculation of pathogen in nasal cavity (max. 5 ml fluid, as described in intranasal vaccination)
- M.hypopneumoniae: Intratracheal a maximum of 2 ml phosphate-buffered saline (PBS) with pathogen will be applied during general anaesthesia.

The challenge with the pathogen is needed to measure efficacy of the vaccination

### Broncho-alveolar lavage (BAL)

- BAL will only be performed in studies, where the development of a local response in the lung has to be addressed. This will take place most probably in the second half of project period.
- BAL will only be performed once in two weeks with a maximum of 4 procedures. The last procedure will be performed just before euthanasia.
- General anaesthesia (injection anaesthesia) will be applied before the procedure
- A tracheal tube will be placed in mouth and upper part of trachea introducing a catheter through the mouth via the trachea in the diaphragmatical lobe.
- 3 time 15 ml of saline fluid will be introduced into the lung and the fluid will be aspirated after each administration

The BAL provides valuable additional information on the development of the local immunity in the lungs being an important parameter since the new vaccines are developed for respiratory pathogens

### Nasal and tonsillar swab

- Will be taken before and after challenge; frequency of sampling will be determined by the type of challenge. Usually, about 7 to 10 sample time points just before and after challenge are defined (PRRS, mycoplasma); this, however is depending on the exact study design and will be discussed with the IVD to minimize the number of sampling time points.
- Restraint is needed to take a nasal swab and for tonsil swab a mouth opener will be used

The swabs are needed to evaluate excretion of pathogen after vaccination and or challenge

### Biopsy sampling:

- General anaesthesia (injection anaesthesia) will be applied before the procedure
- Biopsies will be performed on the site of patch administration and on control sites
- If several patches are administered and the animal should be kept in the study biopsies are taken from a maximum of 2x2 sites, otherwise the pig will be euthanized.

Skin biopsies will be necessary to determine the early local immune reaction after vaccination with DMN patches.

### Euthanasia

- Animals will be sedated before euthanasia

- Tissue and blood sampling after euthanasia and BAL if applicable
- Extensive sampling of tissue and blood and evaluation of the pathologic findings is needed to make a complete interpretation of the vaccine efficacy and immunogenicity

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

For the individual studies data from own previous experiments (Vet Microbiol 163: 1) and from literature review were used to estimate the number of animals to be used and the expected differences in the key parameters of the experiment.

Depending on the key parameter necessary group sizes can vary. This results together with the expected relative standard deviation has been used in a statistical computer program (R studio) to calculate the expected number of needed animals for significant study results. Studies will be designed to achieve a power of 0.8 and a significance level of  $P < 0.05$ .

In the course of the project, for each study plan a calculation of the number of the minimal number of animals will be justified on the above mentioned criteria.

### **B. The animals**

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

Specific pathogen free pigs (male and female) of a high health breeding farm are being used.

In total maximal 200 animals will be used with variable ages. This number is based on statistical evaluation and the necessary number of control animals combined with literature review and will be adjusted based on the results of the consecutive experiments in this project.

A maximum of 45 animals of the 200 animals will be < 1 week (neonatal) at the start of the experiment. These animals weaned at about one day after birth, so that they are enabled to take up sufficient colostrum. The earlier weaning is necessary to acquire sufficient piglets with different genetic background without necessity to also include sows in the experiment.

Neonatal piglets are needed to investigate the influence of age on vaccination efficacy.

### **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: for the safety of the vaccination and measurement of the efficacy use of the target animal is needed. The complex interaction between pathogen, vaccination and immunity of target animal cannot be replaced by model in which no animals are used. New vaccines will be first tested in cell cultures (in vitro) before testing on the target animal, to prevent unnecessary animal use.

Reduction: In each experiment a critical evaluation will be done in regard to necessary minimal number of animals to the key parameters. This evaluation is based on a range of own experiments in the case of PRRSV and will be discussed with experienced colleagues from the field of mycoplasma research for M. hyo.

Refinement: the animals will be accommodated according to European guidelines with extra attention for the size of the groups, optimal feeding and drinking, stable climate, ground cover and toys. The animals will be monitored twice a day during critical periods of the experiment or during veterinary emergency.

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

The described procedures in 2A can cause pain and fear for the animals and the challenge with the pathogen can cause illness and suffering. For the blood sampling, nasopharyngeal swab sampling, vaccination and challenge with pathogen no measures will be taken to minimize the pain and fear. The BAL sampling and biopsy procedure will be performed under general anaesthesia and the animals will be sedated before euthanasia to minimize pain and fear.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

The described experiments have not previously been performed based on review of published articles.

## 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.

All pigs, which are used at an age older than 6 weeks will be kept according to Annex III. Very early weaned pigs (one day old when they are separated from the sow) will be kept in housing conditions with bedding and shelter with a heating source and extra attention will be paid to room temperature. In the first days extra attention will be paid to the ability of the individual pig to take up special baby pig milk. This will be controlled at least four times per day in the first three days.

### 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.

The animals will be anaesthetized before euthanasia to reduce fear and ensure that the fluid used for this procedure will be strictly intravenously.  
BAL sampling and biopsy procedures will be done under general anaesthesia. The other procedures will be performed without sedation. The blood sampling, nasopharyngeal swab sampling and vaccination will cause fear and a minimal amount of short pain, but an sedation prior to these procedure will cause the same level of discomfort as the procedure by itself.

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

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

The challenge with the virus can cause illness and discomfort (especially if control animals are used) and the vaccination can cause a local reaction in the muscle and skin. Blood sampling can induce the formation of an hematoma around the punctured blood vessel. PRRSV infection courses usually subclinical effects with a short (1-3 day) increased body temperature. M. hyo infection can cause mild respiratory distress symptoms.

Explain why these effects may emerge.

Although it is likely that vaccination will prevent illness after challenge in the most cases , there will always be individual variability and animal can be affected and show clinical illness. The control animals will experience mild respiratory problems.

Application of vaccination fluid in skin or in muscle can give a local reaction in and around the injection side. Although it is not expected it cannot be excluded that new adjuvants can induce side effects at the location of vaccination.

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

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

### **J. Humane endpoints**

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

No > Continue with question K.

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

- Severe respiratory distress/ open mouth breathing
- Blue discoloration of ear tips and distal ends of limbs (hypoxia/ischaemia)
- According to Good Veterinary Practice

Indicate the likely incidence.

This incidence is unlikely.

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

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

Blood sampling- moderate

Vaccination- moderate

BAL- mild/ moderate

Challenge with pathogen- moderate

Overall discomfort- moderate

Euthanasia - mild

**End of experiment**

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The extensive sampling of variable tissues cannot be combined with recovery after the procedure and euthanasia is needed to prevent severe discomfort.

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.  <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	3	<i>Eimeria</i> vaccination studies in chickens with or without challenge

#### 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.

***Eimeria*** spp. are intestinal parasites, which are responsible for enteric coccidiosis in chickens. This disease has a severe course in young chickens and prevention requires either vaccination with a costly live vaccine or an extensive chemoprophylaxis.

The focus of the project group of the institute (PG) for the *Eimeria* vaccination is the route of vaccination and time of vaccination which can contribute to a more effective immune response. Oral vaccination which is commonly used will be compared to spray vaccination and in ovo vaccination. Vaccine routes will be compared for their general efficacy (immunogenicity) with a focus on local mucosal immunity in lung and intestine. This local immunity, and how the most effective response can be obtained is of great importance, because the mucosa in lung and intestine form often the primary barrier to invading pathogens.

In-ovo vaccination has several advantages, e.g. reliable and accurate delivery, minimal handling of chicken and less labour-intensive combined with early onset of immunity. The induction of local mucosal immunity in lung and intestine has not been investigated yet and will be compared to oral and spray vaccination on day of hatch or around 16 days after hatch.

Within the EU programme the PG will perform one vaccination study which will initially start with one animal experiment. But more experiments (up to 3) can be needed to address the specific research question.

Induction of mucosal response/ immunity after in ovo vaccine compared to oral and spray vaccine administration directly after hatch in chicken

The mucosal response in the respiratory tract and intestinal tract after in ovo vaccination with *Eimeria* antigens in comparison with *Eimeria* live vaccines will be studied in chicken and compared to responses obtained after vaccination directly after hatch or around 16 days after hatch by spray or oral route. The immune responses in the mucosal surface (lung and intestine) will be analyzed at several time points after vaccination to measure initial response of the vaccine in the mucosal side. The early immune response will be measured, so initially there will be no challenge with a pathogen. In the end additional challenge can be needed to measure vaccine efficacy and immunogenicity.

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

#### Vaccination

- Oral vaccination: 0.5 ml of vaccine fluid will be orally inoculated
- Spray vaccination in a manual system. The droplet size will be calculated accordingly to the nozzle type and air pressure used in the system
- In ovo vaccination: vaccine mixture into the large end of each egg through with a fine needle
- Vaccination is needed to conduct the experiment (purpose of experiment)

#### Blood sampling

- Blood will be extracted at various time points in the procedure from the brachial wing vein
- The extracted volume will never exceed 8ml/kg body weight within 2 weeks ( according to Handboek Proefdierkunde, vijfde druk)
- Repeated blood sampling is needed to evaluate the efficacy of the vaccination at different time points in the experiment

#### Challenge with pathogen

- Inoculation of *Eimeria* (sporulated oocysts) in oral cavity (max. 0.5 ml fluid)
- Challenge is needed to measure efficacy of the vaccine

#### Euthanasia

Cervical dislocation

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

Extensive literature review has been conducted to evaluate the number of used animals and the expected differences in the investigated immune parameters (leucocytes (including phenotyping), cytokines and chemokines) in comparable experiments. These expected difference in parameters (20-50%) together with the expected relative standard deviation, statistical power of 80% were used in a statistical computer programme (R studio) to calculate the expected minimal number of needed animals for significant study results. In the end the different groups of the experiment will be compared with a Student-t-test or ANOVA with a significant result for  $P < 0.05$ .

### **B. The animals**

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

One day old commercial Cobb-Vantress chickens provided by a commercial breeder who is a partner of the EU project. This specific breed is one of the commonly used chickens in the poultry industry. The estimated number is 120 chickens which will be all male or female to minimize the variation (standardization).

Additional 40 chicks will be used which have been vaccinated in ovo on day 18 after fertilization (18ED). For standardization these chicks will be male or female.

### **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: For the measurement of the initial response of the vaccination and the immune responses the use of the target animal (chicken) is needed. The complex interaction between host, vaccination and immunity of target animal cannot be replaced by a model in which no animals are used.

Reduction: a thorough literature review had been conducted to see if no unnecessary experiments will be performed and to get an overview in the number of animals needed to get statistically significant results. A close estimation of the number of animals needed has also been calculated with a statistic computer program based on the expected difference in the used parameters and the relative standard deviation and needed statistical power.

Within the EU programme there is a close collaboration with the different partners resulting in combined experiments with multiple research question reducing the needed number of experiments.

Refinement: the animals will be accommodated according to European guidelines with extra attention for the size of the groups, optimal feeding and drinking and stable climate.

The animals will be monitored daily and multiple times a day during critical periods of the experiment or during veterinary emergency.

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

The described procedures in 2A cause minimal pain and fear for the animals. For the blood sampling and vaccination no measures will be taken to minimize the pain and fear. Adverse effects on the environment will be not expected.

### **Repetition and duplication**

#### **E. Repetition**

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

The described experiments has not previously been performed based on review of published articles.

### **Accommodation and care**

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

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

The possible pain experience during blood sampling is minimal and no pain relief method is needed.

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

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

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

The animals may experience mild to moderate intestinal problems after the challenge and less likely after vaccination (the vaccine is composed of a low dose of *Emeria oocyst*).

Explain why these effects may emerge.

The challenge with the pathogen causes moderate intestinal illness which will be closely monitored. Although it is unlikely that vaccination will cause illness, there will always be individual variability and animal can be affected and show clinical illness.

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

Vaccinated animals will be closely and daily monitored for illness. The following parameters will be measured daily (general impression (activity), respiration rate, food consumption). In case of illness and discomfort responsible veterinarian will be consulted and with severe illness and suffering (human endpoint) the animal will be euthanized.

### J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

- Severe respiratory distress
- Severe paresis or paralysis
- According to Good Veterinary Practice

Indicate the likely incidence.

The incidence is unlikely.

### K. Classification of severity of procedures

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

Blood sampling- mild

Vaccination-mild  
Euthanasia- mild  
Challenge with pathogen in non-vaccinated animals- moderate  
Overall discomfort- moderate

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The extensive sampling of variable tissues cannot be combined with recovery after the procedure and euthanasia is needed to prevent severe discomfort.

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



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

Geachte CCD,

Onderstaand het advies dat de DEC-WUR heeft gegeven aangaande het project  
"Improvement of Animal health and Production by Innovative Vaccination  
Strategies"

#### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD401002015356**
2. Titel van het project: Improvement of Animal health and Production by Innovative Vaccination Strategies
3. Titel van de NTS: Verbetering van Gezondheid en Productie in Veehouderij door Optimale Vaccinatie
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:  
DEC-WUR  
[REDACTED]
6. Adviestraject  
Ontvangen door DEC: 28-12-2015 (23-12-2015 al door CCD verstuurd maar niet aangekomen)  
Aanvraag compleet: 28-12-2015  
In vergadering besproken: 18-01-2016

Dierexperimenten  
Commissie WUR

DATUM  
27 januari 2016

ONDERWERP  
aanvraag projectvergunning  
AVD401002015356

ONS KENMERK  
AVD401002015356

INTERNET  
www.wageningenUR.nl

KVK NUMMER  
09098104

CONTACTPERSOON  
[REDACTED]

TELEFOON  
[REDACTED]

E-MAIL  
[REDACTED]

7. Correspondentie met de aanvrager

Datum vragen: 19-01-2016

Strekking van de vragen:

- Redactionele verbeteringen
- De DEC heeft vragen gesteld over:
  - Het gebruik van de patches

Datum antwoorden: 21-01-2016

Strekking van de antwoorden:

- De voorgestelde redactionele aanpassingen zijn overgenomen door de onderzoeker
- op vragen van de DEC:
  - De patches worden op onbehaarde of onthaarde huid gebruik en blijven ca. 24 uur zitten.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

**C. Beoordeling (inhoud)**

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord is.
2. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofdoelstelling.
3. Het substantiële belang van het project, te weten een effectievere vaccinatie van dieren waardoor uiteindelijk indirect een bijdrage geleverd kan worden aan verminderd antibioticagebruik en minder resistente bacteriën, wordt door de DEC onderschreven.
4. De DEC stelt vast dat de expertise van de onderzoekers, de voorzieningen waar de experimenten uitgevoerd worden en de onderzoeksstrategie kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling van het project.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "moderate" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit bloedafname, vaccinatie, challenge en ziekteverschijnselen a.g.v. de challenge
7. De DEC heeft vastgesteld dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. De complexe interactie tussen ziektekiem, vaccinatie en afweer kan niet anders dan *in vivo* onderzocht worden.
8. De DEC heeft vastgesteld dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Veiligheid en effectiviteit worden in eerste instantie op celkweek getest alvorens de vaccins in het dier worden getest. De aanvrager beschikt over voldoende expertise om te voorkomen dat eerder gedaan onderzoek herhaald wordt. Ook zijn literatuuronderzoek en statistische analyse uitgevoerd om het aantal dieren zo beperkt mogelijk te houden.
9. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De huisvesting en verzorging van de dieren voldoen aan de eisen die de wet stelt. Hoewel de proefopzet daar geen aanleiding voor geeft zijn HEP's gedefinieerd. De DEC is overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
10. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.

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

DATUM  
27 januari 2016

ONS KENMERK  
AVD401002015356

PAGINA  
3 van 3

#### **D. Ethische afweging**

- De DEC is in consensus van mening dat het doel en de haalbaarheid van het project het gebruik van proefdieren en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan rechtvaardigt. Dit project kan een bijdrage leveren aan het verkrijgen van beter weerbare en gezondere dieren en daarmee uiteindelijk aan terugdringen van antibioticagebruik. De uitvoering is verder niet in strijd met andere ethische overwegingen m.b.t. het gebruik van proefdieren.

#### **E. Advies**

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

Met vriendelijke groet,









> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Postbus 59

6708 AB WAGENINGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD401002015356

**Bijlagen**

2

Datum 23 december 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 21 december 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD401002015356. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 40100

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

Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde:

KvK-nummer: 9098104

Straat en huisnummer: Akkermaalsbos 12

Postbus: 59

Postcode en plaats: 6708 AB WAGENINGEN

IBAN: NL10RABO0397066465

Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Wageningen UR

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie:

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 maart 2016  
Geplande einddatum: 31 december 2019  
Titel project: Improvement of Animal Health and Production by Innovative Vaccination Strategies  
Titel niet-technische samenvatting: Verbetering van Gezondheid en Productie in Veehouderij door Optimale Vaccinatie  
Naam DEC: DEC Wageningen UR  
Postadres DEC: Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen  
E-mailadres DEC: dec@wur.nl

**Betaalgegevens**

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

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Wageningen  
Datum: 21 december 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Postbus 59

6708 AB WAGENINGEN UR



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD401002015356

**Bijlagen**

2

Datum 23 december 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 23 december 2015

Vervaldatum: 22 januari 2016

Factuurnummer: 15700356

Ordernummer: WUR921840

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD401002015356	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek

████████████████████  
Postbus 59  
6700AW Wageningen  
████████████████████

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.centrale  
commissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD401002015356

**Uw referentie**

**Bijlagen**  
1

Datum 2 februari 2016  
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte ██████████

Op 21 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Improvement of Animal health and Production by Innovative Vaccination Strategies" met aanvraagnummer AVD401002015356. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Welke informatie nog nodig**

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

- 1) In uw projectvoorstel beschrijft u drie verschillende focusgebieden. Een opsomming van de concrete doelstellingen/onderzoeksvragen ontbreekt echter. Aangezien de CCD de doelstellingen, het belang van de doelstellingen en de haalbaarheid van de doelstellingen moet meenemen bij de ethische afweging, is het van belang dat de specifieke doelstellingen van uw project volkomen helder zijn.
  - U wordt verzocht aan te geven wat het directe doel is van het project waarvoor een vergunning wordt aangevraagd.
  - U wordt verzocht een overzicht te geven van de belangrijkste onderzoeksvragen.
  - Daarnaast wordt u verzocht te onderbouwen op welke wijze de verschillende onderzoeksvragen samenhangen en wat de relatie met het directe doel is.
- 2) In uw aanvraag beschrijft u enerzijds nieuwe vaccins tegen drie verschillende ziektes, twee in varkens en een in kippen te willen ontwikkelen, en anderzijds drie onderzoek focus te hebben. Het is voor ons niet duidelijk wat de samenhang tussen deze drie vaccins is, behalve dat ze binnen dezelfde EU programma onderzocht worden. In het kader van de toetsbare eenheid verzoeken we om uit te leggen hoe de vaccins met elkaar samenhangen, waarom zijn alle proeven nodig om de doelstelling te bereiken, en waarom ze niet als zelfstandige projecten kunnen (per vaccin of per focus).

3) U beschrijft in uw aanvraag drie dierproeven te willen uitvoeren. Het is voor ons niet duidelijk wat de volgorde van de dierproeven is, of ze op elkaar volgen of in parallel worden gedaan, en of er go/no-go of beslismomenten in de experimentele opzet opgenomen zijn. In het kader van vermindering en verfijning verzoeken we u om duidelijk go/no-go of beslismomenten tussen de dierproeven en binnen de dierproeven, en de criteria waarop gekozen wordt een vervolgstap wel of niet uit te voeren duidelijk en uitgebreid te beschrijven.

**Datum**

2 februari 2016

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD401002015356

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

**Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Gebruik hierbij het formulier dat u bij deze brief krijgt indien u uw antwoord per post verstuurt.

Om u aanvraag in de eerstkomende CCD vergadering te kunnen bespreken ontvangen we graag uw antwoord uiterlijk **dinsdag 9 februari 2016**.

**Wanneer een beslissing**

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post





## Melding

### Bijlagen via de post

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

### 1 Uw gegevens

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

### 2 Bijlagen

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

### 3 Ondertekening

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

Datum 8 februari 2016  
 Betreft Aanvulling aanvraag projectvergunning dierproeven  
 Aanvraagnummer AVD401002015356  
 Project "Improvement of Animal Health and Production by Innovative Vaccination Strategies"

Geachte CCD,

Wij beseffen de complexiteit van onze projectaanvraag met meerdere dierproeven en betreuren het dat wij niet erin zijn geslaagd om dit voldoende duidelijk te verwoorden. Graag willen wij in dit aanvullende document uw vragen beantwoorden en hopen dat deze aanvullende informatie duidelijk genoeg is om tot een weloverwogen oordeel te kunnen komen. Na telefonisch overleg op 2 februari hebben wij besloten om in een aanvullend document in het Nederlands de vragen te beantwoorden. Om de vragen zo overzichtelijk mogelijk te beantwoorden, herhalen wij in dit document eerste de gestelde vraag, waarbij we de sleutel woorden onderstrepen en deze woorden in het antwoord laten terugkomen.

### **Vraag 1**

1) In uw projectvoorstel beschrijft u drie verschillende focusgebieden. Een opsomming van de concrete doelstellingen/onderzoeksvragen ontbreekt echter. Aangezien de CCD de doelstellingen, het belang van de doelstellingen en de haalbaarheid van de doelstellingen moet meenemen bij de ethische afweging, is het van belang dat de specifieke doelstellingen van uw project volkomen helder zijn.

-U wordt verzocht aan te geven wat het **directe doel is van het project** waarvoor een vergunning wordt aangevraagd.

-U wordt verzocht **een overzicht te geven van de belangrijkste onderzoeksvragen.**

-Daarnaast wordt u verzocht te onderbouwen op welke wijze de verschillende onderzoeksvragen **samenhangen en wat de relatie met het directe doel is.**

### **Antwoord vraag 1**

Wij hebben in het projectvoorstel onder 3.1 geprobeerd de samenhang van ons project in de context van onze samenwerking binnen het EU programma te schetsen. Hier willen wij duidelijk maken, dat ons instituut als onderdeel van dit EU programma in het projectvoorstel zowel uitvoerend is, omdat wij over de juiste faciliteiten en kennis beschikken, als ook eigen specifieke onderzoeksdoelen vervolgt.

In 3.2 zijn onze specifieke activiteiten en doelstellingen weergegeven. De directe doelstellingen in het projectvoorstel worden beschreven in de drie focusgebieden met bijpassende onderzoeksvragen, die allemaal terug te voeren zijn op **het directe doel** van het project: "optimale vaccinatie tegen belangrijke endemische pathogenen bij varken (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus* (PRRSV) en *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo)) en kip (*Eimeria* spp.)". Zoals in het voorstel weergegeven zijn een deel van de dierproeven onderdeel van een promotieonderzoek naar kennis en optimalisatie van vaccinatie van pasgeboren landbouwhuisdieren (varken en kip).

In focusgebied a) "New vaccine candidates" testen wij voor het EU programma nieuw ontwikkelde vaccin kandidaten voor een drietal bedrijfsgebonden dierziekten (PRRSV, M.hyo en Eimeria). De ontwikkeling van de betreffende vaccins gebeurt in andere partner instituten in het EU programma en onze activiteit en **onderzoeksvraag** is hier uitsluitend om de immunogeniteit en effectiviteit in het immunocompetente doeldier (kip en varken) te testen voor deze nieuwe vaccin kandidaten. Deze kennis is voor het EU programma ten aanzien van de effectiviteit van de nieuwe vaccins belangrijk. Dit onderzoek is voor ons instituut eveneens van belang om hiermee referentiewaardes te generen voor de onderzoeken naar de rol van nieuwe, beter geschikte administratieroutes van vaccins en de vaccinatie van neonaten in focus a) en c).

In focusgebied b) is onze directe doelstelling twee alternatieve administratieroutes te onderzoeken, namelijk de transcutane vaccinatie route m.b.v. pleisters bij varkens en de in ovo vaccinatie in kippen. Beide onderzoeken worden in aanvullende vorm ook bij partners binnen het EU programma

uitgevoerd. Onze **onderzoeksvraag** is om te onderzoeken of de vaccinatieroutes effectief zijn en welke immunologische mechanismen lokaal en systemisch een rol spelen bij de inductie van immuniteit via deze routes, waarbij de nadruk wordt gelegd op ontwikkeling van lokale en mucosale immuniteit in darmen en luchtwegen.

In focusgebied c) is onze directe doelstelling verdere kennisontwikkeling omtrent de immuunreactie in het pasgeboren, jonge dier, waarbij wij voor deze onderzoeken gebruik maken van de nieuwe vaccins, maar ook van de kennis die bij andere partners ten aanzien van de werking van adjuvantia, die gebaseerd zijn op combinatie van verschillende Toll Like receptoren (TLR) en nanotechnologie in volwassen dieren. **De onderzoeksvraag** voor deze focus is met name of de effectiviteit van de vaccinatie en met name het adjuvants gerelateerd kan worden aan de leeftijd van het dier.

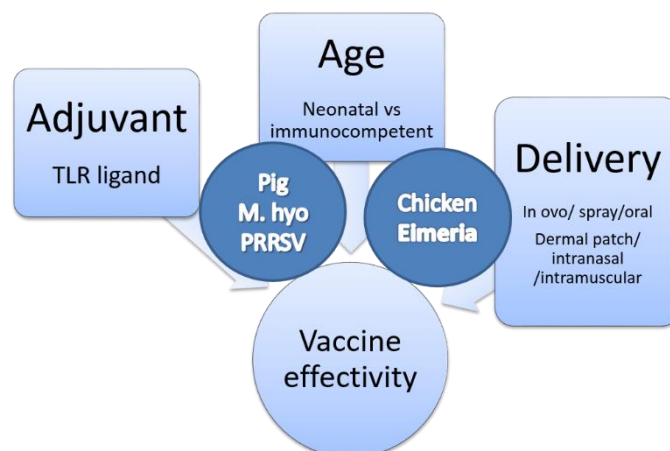
## **Vraag 2**

In uw aanvraag beschrijft u enerzijds nieuwe vaccins tegen drie verschillende ziektes, twee in varkens en een in kippen te willen ontwikkelen, en anderzijds drie onderzoek focus te hebben. Het is voor ons niet duidelijk wat de **samenhang tussen deze drie vaccins** is, behalve dat ze binnen dezelfde EU programma onderzocht worden. In het kader van de toetsbare eenheid verzoeken we om uit te leggen hoe de vaccins met elkaar samenhangen, **waarom zijn alle proeven nodig** om de doelstelling te bereiken, en waarom ze niet als zelfstandige projecten kunnen (per vaccin of per focus).

## **Antwoord vraag 2**

Het is gebruikelijk dat er een taakverdeling in EU projecten wordt gehandhaafd om hiermee vooral onderzoek te bespoedigen en onderdelen van onderzoek op die plekken te laten uitvoeren, waar de beschikbare expertise en faciliteiten zijn. Zoals boven al vermeld, zijn wij bij het testen van de nieuw ontwikkelde vaccins in eerste instantie de partner, die deze vaccins in het doeldier varken en kip gaat testen. Daarom is er op voorhand **geen directe samenhang** tussen deze drie vaccins, behalve het feit dat alle drie de vaccins worden onderzocht op effectiviteit met daarnaast de invloed van leeftijd en toedieningswijze (zie figuur 1). Echter voor onze doelstellingen ten aanzien van de rol van de administratieroutes (transcutaan, oraal, aerogeen of in-ovo) en de immuunreactie in de neonat zijn de gegevens uit de immunogeniteits/effectiviteitsstudies ter vergelijking van belang

Wij hebben bij het schrijven van het voorstel overwogen meerdere projectvoorstellen in te dienen, maar zijn tot de conclusie gekomen, dat dit geen recht zou doen aan het concept van het onderzoek.



*Figuur 1*

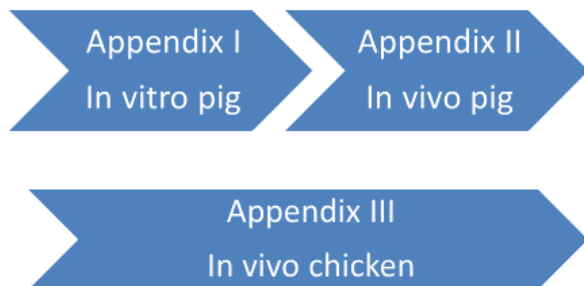
### **Vraag 3**

U beschrijft in uw aanvraag drie dierproeven te willen uitvoeren. Het is voor ons niet duidelijk wat de volgorde van de dierproeven is, of ze op elkaar volgen of in parallel worden gedaan, en of er go/no-go of beslismomenten in de experimentele opzet opgenomen zijn. In het kader van vermindering en verfijning verzoeken we u om **duidelijk go/no-go of beslismomenten tussen de dierproeven en binnen de dierproeven**, en de criteria waarop gekozen wordt een vervolgstap wel of niet uit te voeren duidelijk en uitgebreid te beschrijven.

### **Antwoord vraag 3**

In de aanvraag staan drie dierproeven beschreven. **De volgorde van de dierproeven** staat aangegeven in figuur 2. De dierproef beschreven in appendix 1 zal de eerste dierproef zijn, waarin dieren uitsluitend worden gebruikt als weefsel/bloeddonor en in vitro wordt gekeken naar de optimale leeftijd in combinatie met het meest geschikte adjuvant en toedieningswijze. De dierproef beschreven in appendix 2 zal pas volgen nadat de dierproef in appendix 1 is afgerond. De resultaten van de proef in appendix 1 alsmede resultaten, die behaald zijn bij andere partners in het EU programma zullen bepalend zijn voor de opzet van de dierproef in appendix 2. De dierproef in appendix 3 verloopt parallel met appendix 1 en 2, omdat dit een ander diersoort betreft.

**Tussen de verschillende dierproeven** (appendix I, II en III) zitten geen afhankelijkheden en zijn er **geen go/ no- go moment gedefinieerd**. Er is geen directe samenhang tussen de proeven in appendix (I en II) en appendix III (kip), daar het verschillende diersoorten betreft. Wel zullen de resultaten van de dierproef beschreven in appendix I (in vitro experiment) worden meegenomen in de opzet van de dierproef voor appendix II, waardoor mogelijk het aantal variabelen wordt verminderd. De opzet van de dierproeven in appendix I en II wordt voor een deel bepaald door de resultaten van dierproeven van andere partners binnen het EU project, die de vaccins en de TLR liganden leveren. De vaccins, die zullen worden gebruikt in appendix III om de verschillende toedieningsroutes te vergelijken zijn voor begin van de studie succesvol in dierstudies getest bij andere partners.



**Figuur 2**

In appendix 2 zijn drie verschillende proeven beschreven, waarbij in elke proef indien van toepassing een **go/no- go beslismoment** bestaat:

- Proef 1 betreft de effectiviteit van een nieuw PRRSV vaccin tegen een heterologe challenge met het PRRS virus. Deze proef wordt alleen uitgevoerd, indien studies bij een partner van het EU programma met een homologe challenge succesvol zijn afgerond.
- Proef 2 bevat een eerste studie, waarin het infectiemodel met een mycoplasma challenge opgezet wordt. Alleen als deze modelontwikkeling succesvol is, dwz. vergelijkbaar met in de literatuur beschreven modellen, zal een effectiviteitsstudie met nieuwe vaccins worden uitgevoerd. Anders zullen deze vaccins alleen ten aanzien van de immunogeniteit worden getest.
- Proef 3 omvat in eerste instantie studies, om het concept van transcutane vaccinatie in neonaten en immunocompetente varkens te analyseren en lokale en systemisch

immunologisch mechanismen te bestuderen na transcutane vaccinatie. Afhankelijk van de aangetoonde bescherming in proef 1 voor de nieuwe PRSS vaccins zal ook de bescherming met het in proef 1 geteste vaccin antigeen in studie 3 worden getest middels transcutane vaccinatie in neonatale en immunocompetente dieren

Wij hopen hiermee de bovenstaande vragen voldoende te hebben beantwoord. We begrijpen echter dat dit projectvoorstel met meerdere dierproeven complex is en willen dan ook graag eventuele onduidelijkheden mondeling toelichten.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Postbus 59  
6708 AB WAGENINGEN  
|||||

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD401002015356  
**Bijlagen**  
1

27 FEB 2016

Datum

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 21 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Improvement of Animal Health and Production by Innovative Vaccination Strategies" met aanvraagnummer AVD401002015356. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 8 februari 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft gereageerd op de vragen van de CCD. U heeft het doel geherformuleerd, u mening over de samenhang van de dierproeven toegelicht en extra informatie over de go/no-go momenten binnen uw experimentele opzet aangeleverd. We kunnen ons vinden in deze nadere aanvullingen van de aanvraag.

#### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de algemen voorwaarden zoals genoemd in de vergunning wat voortvloeit uit artikel 10a. lid 1 van de wet. U kunt met uw project "Improvement of Animal Health and Production by Innovative Vaccination Strategies" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 maart 2016 tot en met 31 december 2019.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR gevoegd. Dit advies is opgesteld op 27 januari 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen het advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering, aangevuld met de twee algemene voorwaarden zoals hierboven gemotiveerd. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

**Bezwaar**

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

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

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

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


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

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

**Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

  
Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

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

## **Projectvergunning**

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

**Naam:** Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek  
(DLO)  
**Adres:** Postbus 59  
**Postcode en plaats:** 6708 AB WAGENINGEN  
**Deelnemersnummer:** 40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 01 maart 2016 tot en met 31 december 2019, voor het project "Improvement of Animal Health and Production by Innovative Vaccination Strategies" met aanvraagnummer AVD401002015356, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]  
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 21 december 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 december 2015;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 december 2015;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 27 januari 2016, ontvangen op 27 januari 2016.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 8 februari 2016



Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Blood and tissue sampling for in vitro studies in pigs	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> ) / Beide geslachten	40	Licht / mild	
Mycoplasma hyopneumoniae (M.hyo) and Porcine Reproductive and Respiratory Virus (PRRSV) vaccination studies in pigs with challenge	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> ) / beide geslachten	200	Matig / moderate	Bloedafnamen-matig Vaccinatie- matig BAL- licht/matig Challenge- matig Cumulatief ongerief-matig Euthanasie -licht
Eimeria vaccination studies in chickens with or without challenge	Kippen / beide geslachten	160	Matig / moderate	Bloedafnamen- licht Vaccinatie- licht Challenge- matig Euthanasie-licht Cumulatief ongerief-matig

#### Voorwaarden

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

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat de go/no go momenten worden afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

# Weergave wet- en regelgeving

## **Dit project en wijzigingen**

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

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

## **Verzorging**

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

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

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

## **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

#### **Einde van een dierproef**

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

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

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

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

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

[REDACTED]

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** maandag 22 februari 2016 15:57  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** Beslissing aanvraag dierproeven  
**Bijlagen:** Beslissing aanvraag dierproeven AVD401002015356.pdf

Geachte heer/mevrouw,

De brief wordt ook per post verstuurd.

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

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

**T: 0900 280028**

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

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** dinsdag 23 februari 2016 10:47  
**Aan:** DEC@wur.nl  
**Onderwerp:** terugkoppeling aanvraag AVD401002015356

Geachte leden van de DEC WUR,

Op 27 januari 2016 heeft u advies uitgebracht op de projectaanvraag met titel 'Improvement of Animal Health and Production by Innovative Vaccination Strategies', en aanvraagnummer AVD401002015356. Wij danken u voor uw advies en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug. De CCD heeft besloten de vergunning te verlenen, onder de volgende algemene voorwaarden:

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat de go/no go momenten worden afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

De CCD heeft de volgende vragen aan de aanvrager voorgelegd:

1) In uw projectvoorstel beschrijft u drie verschillende focusgebieden. Een opsomming van de concrete doelstellingen/onderzoeksvragen ontbreekt echter. Aangezien de CCD de doelstellingen, het belang van de doelstellingen en de haalbaarheid van de doelstellingen moet meenemen bij de ethische afweging, is het van belang dat de specifieke doelstellingen van uw project volkomen helder zijn.  
-U wordt verzocht aan te geven wat het directe doel is van het project waarvoor een vergunning wordt aangevraagd.  
-U wordt verzocht een overzicht te geven van de belangrijkste onderzoeksvragen.  
-Daarnaast wordt u verzocht te onderbouwen op welke wijze de verschillende onderzoeksvragen samenhangen en wat de relatie met het directe doel is.

2) In uw aanvraag beschrijft u enerzijds nieuwe vaccins tegen drie verschillende ziektes, twee in varkens en een in kippen te willen ontwikkelen, en anderzijds drie onderzoek focus te hebben. Het is voor ons niet duidelijk wat de samenhang tussen deze drie vaccins is, behalve dat ze binnen dezelfde EU programma onderzocht worden. In het kader van de toetsbare eenheid verzoeken we om uit te leggen hoe de vaccins met elkaar samenhangen, waarom zijn alle proeven nodig om de doelstelling te bereiken, en waarom ze niet als zelfstandige projecten kunnen (per vaccin of per focus).

3) U beschrijft in uw aanvraag drie dierproeven te willen uitvoeren. Het is voor ons niet duidelijk wat de volgorde van de dierproeven is, of ze op elkaar volgen of in parallel worden gedaan, en of er go/no-go of beslismomenten in de experimentele opzet opgenomen zijn. In het kader van vermindering en verfijning verzoeken we u om duidelijk go/no-go of beslismomenten tussen de dierproeven en binnen de dierproeven, en de criteria waarop gekozen wordt een vervolgstap wel of niet uit te voeren duidelijk en uitgebreid te beschrijven.

De aanvrager heeft voldoende beantwoord.

We hopen u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd.

Met vriendelijke groet,

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

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

.....  
**T: 0900 2800028**

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