

	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
	NTS2015357								
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 terugkoppeling DEC 26-2-2016				x		x		

24 DEC 2015



Centrale Commissie Dierproeven

AVD104002015357

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in	10400															
		☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen																
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Wageningen University</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td></td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>9215846</td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Akkermaalsbos 12</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>59</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6700 AB Wageningen</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL10 RABO 0397066465</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Wageningen UR</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Wageningen University	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde		KvK-nummer	9215846	Straat en huisnummer	Akkermaalsbos 12	Postbus	59	Postcode en plaats	6700 AB Wageningen	IBAN	NL10 RABO 0397066465	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR
Naam instelling of organisatie	Wageningen University																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde																		
KvK-nummer	9215846																	
Straat en huisnummer	Akkermaalsbos 12																	
Postbus	59																	
Postcode en plaats	6700 AB Wageningen																	
IBAN	NL10 RABO 0397066465																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR																	
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>																	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td>☒ Dhr. ☐ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres			
(Titel) Naam en voorletters		☒ Dhr. ☐ Mw.																
Functie																		
Afdeling																		
Telefoonnummer																		
E-mailadres																		
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td>☒ Dhr. ☐ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres			
(Titel) Naam en voorletters		☒ Dhr. ☐ Mw.																
Functie																		
Afdeling																		
Telefoonnummer																		
E-mailadres																		

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

(Titel) Naam en voorletters

☐ Dhr. ☐ Mw.

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

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

☒ Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?

☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3

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

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2

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

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

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

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

☐ Nee > Ga verder met vraag 3

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

☐ Nee > Ga verder met vraag 3

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

3 Over uw project

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

Startdatum 01 - 01 - 2016

Einddatum 31 - 12 - 2020

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Consequences of divergent selection for *natural antibodies* in chicken

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

Gevolgen van selectie voor hoge en lage *natuurlijke weerstand* in kippen

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

Naam DEC DEC Wageningen University

Postadres Postbus 9101, 6700 HB Wageningen

E-mailadres dec@wur.nl

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741 Lege

☐ Wijziging € Lege

☐ Via een eenmalige incasso

☒ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

- ☒ Projectvoorstel en bijlagen beschrijving dierproeven (3x)
- ☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

- ☒ Melding Machtiging – mandaatbesluit

☐

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

23 - 12 - 2015

Handtekening



Format

Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

Belangrijke doelstellingen in de pluimveefokkerij zijn, naast een gebalanceerde toename in productie en

efficiëntie, het verkrijgen van dieren met een hogere resistentie tegen liefst meerdere ziektes (algemene ziekte resistentie) en het minimaliseren van microbiële contaminatie tussen dieren. Dit mede omdat gebruik van antibiotica beperkt is. Daarnaast heeft de (intensieve) pluimveehouderij een negatief imago in de maatschappij als gevolg van verminderd dierwelzijn en een relatief hoge, niet-gedefinieerde mortaliteit. Het fokken van kippen op een betere gezondheid is gecompliceerd, onder andere door afwezigheid van effectieve, eenvoudig-te-meten selectie criteria. Tot op heden heeft genetische selectie op immuniteit en immuun-gerelateerde kenmerken vooral geresulteerd in selectie op een verhoogde en vaak verbeterde adaptieve immuniteit (bijvoorbeeld specifieke antilichaamrespons) tegen specifieke antigenen/pathogenen. Echter dergelijke selectie is moeilijk toepasbaar door relatief hoge kosten en een relatieve lage opbrengst. Hierbij wordt ook vaak t.g.v. de selectie op de specifieke reactie slechts immuniteit verkregen tegen één pathogeen. Daarnaast evolueren microben sneller dan dieren en dierpopulaties zelf (als gevolg van natuurlijke mutatie of selectie) en zijn goedkope en effectieve vaccins voorhanden. Natuurlijke antilichamen (NAb) worden verondersteld te functioneren als een aspecifieke 'first line of defense' tegen virale en bacteriële infecties. Door hun relatief hoge niveaus en hun aspecificiteit (d.w.z. NAb binden meerdere niet-gerelateerde antigenen) remmen ze de entree en spreiding van infectieuze agens, zonder eerdere vaccinatie. Daarnaast bieden NAb tijd voor een ontwikkeling van de specifieke immuunrespons, kunnen NAb de *pool* vormen van waaruit specifieke antilichamen tijdens de infectie gerekruteerd worden en vormen NAb een essentiële link tussen het innate immuunsysteem en het adaptieve immuunsysteem. Een 'tekort' of gebrek aan NAb is (vooral bij de mens) ook gerelateerd aan een hogere kans op ontstekingsreacties, auto-immuniteit en/of metabole aandoeningen, omdat NAb verbindingen die ontsteking kunnen veroorzaken (endotoxines of celafvalproducten), kunnen wegvangen. Hoewel NAb bij alle geteste diersoorten zijn aangetroffen, is de exacte functie en regulatie bij de landbouwhuisdieren nauwelijks bekend.

Voor de kip zijn grote hoeveelheden NAb gericht tegen keyhole limpet hemocyanin (KLH) aangetoond. Anti-KLH NAb zijn eenvoudig en goed meetbaar vanaf 16 weken leeftijd. Eerdere studies hebben aangetoond dat:

- NAb-niveaus tegen KLH rond 16 weken erfelijk zijn ($h^2=0,12$).
- kippen met een hoog niveau aan NAb tegen KLH een verlaagd risico op sterfte hebben, gepaard met een verhoogde mate van immuunreactiviteit. Dit kan worden verklaard door de eerder genoemde functies die NAb hebben binnen het immuunsysteem.
- genetische correlaties aanwezig zijn tussen het niveau van NAb en genen die coderen voor andere belangrijke immuuncomponenten.

In 2013 is gestart met een STW-project, waarbij kippen divergent geselecteerd worden op hoge of lage niveaus van natuurlijke antilichamen gericht tegen het antigeen keyhole limpet hemocyanin (KLH) op zestien weken leeftijd. In een eerder experiment zagen we dat de twee NAb-selectielijnen immunologisch verschilden in hun reactie tegen verschillende andere modelantigenen. Daarnaast zagen we dat de lage NAb-selectielijn een veel hogere mortaliteit (2 keer hoger) vertoonde dan de hoge NAb-selectielijn na een intratracheale *E. coli*-infectie. In eerdere studies met NAb in kippen (overigens niet geselecteerd voor NAb) werden hoge NAb-niveaus geassocieerd met een hogere kans op overleving vergeleken met kippen met lage NAb-niveaus. Een positief effect van NAb op de 'natuurlijke ziekteresistentie' van kippen lijkt dus sterk aanwezig. Dit effect kan ook grotendeels verklaard worden op basis van bekende functies van NAb beschreven in (humane en murine) literatuur.

Voor toepassing van selectie op NAb in de dierhouderij (c.q. pluimveefokkerij), dient eerst meer informatie verkregen te worden over de selectie van kippen op basis van KLH-bindende NAb, evenals het effect van deze selectie op ziekteverwekkers en (andere) immunologische componenten. Dit projectvoorstel voorziet in een aantal proeven om meer inzicht te krijgen in de gevolgen en de toepasbaarheid van selectie voor NAb in pluimvee door vergelijking van selectielijnen. Vanaf generatie 5 kunnen we tevens de originele controlelijn (de purebred WA line van ISA) in de experimenten gebruiken. Alle beschreven dierproeven worden uitgevoerd op de NAb-selectielijnen en indien mogelijk op de controlelijn.

Samenvatting koepelaanvraag (DEC Wageningen referentie: 2014081):

Het directe doel van dit experiment is het fokken van kippen divergent geselecteerd op een hoog dan wel laag niveau van natuurlijke antilichamen (NAb) gericht tegen het antigeen keyhole limpet hemocyanin (KLH) op 16 weken leeftijd. De selectieprocedure is begonnen in 2013 en op het moment van indienen

van deze koepelaanvraag, zijn drie generaties gefokt. Het selecteren op NAb was in theorie mogelijk op grond van berekende erfelijkheidsgraden in diverse experimenten, maar is in de praktijk in dit project ook succesvol gebleken. Dit is voor ons reden om ook de vijf nog geplande generaties aan te vragen in deze koepelaanvraag. In het kader van het door STW gefinancierde project zal de mogelijkheid onderzocht worden of kippen divergent geselecteerd kunnen worden op NAb-niveaus tegen KLH, en wat de consequenties van deze selectie zijn voor ziekteresistentie en immunologische en fysiologische eigenschappen. Naar verwachting is generatie 5 nodig voor het volbrengen van het PhD-project, generatie 8 is nodig voor het volbrengen van het Postdoc-project (nog te starten). Deze koepelaanvraag wordt uitgevoerd tussen vanaf 01-03-2015 tot 31-12-2017. De individuele generatieaanvraag zal ongeveer elke 35 weken (lengte generatie-interval) gebeuren.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Dit project heeft als doel meer inzicht te geven in:

- KLH-bindende NAb: Met zeer grote zekerheid kan worden gezegd dat kippen nooit KLH hebben 'gezien' en zullen 'zien' en met een zelfde zekerheid kunnen we dus stellen dat kippen dus daadwerkelijk natuurlijke antilichamen bezitten tegen KLH. Opmerkelijk is de grote hoeveelheid NAb tegen KLH, maar waarvan de oorzaak niet bekend is. Het is niet bekend welke componenten van KLH nu exact herkend worden. Met dit projectvoorstel willen we meer te inzicht krijgen in de actieve componenten (epitopen) van KLH en dus de actieve componenten op grond waarvan wij de selectie bepalen.
- Het gevolg van selectie op immunologische parameters, anders dan KLH-bindend NAb: Het selecteren voor hoge of lage niveaus van NAb heeft geleid tot twee kippenlijnen met sterk verschillende niveaus van NAb (ook tegen andere antigenen). Echter vanwege de complexiteit van het immuunsysteem, is het zeer waarschijnlijk dat de selectie ook effect heeft op andere componenten van het immuunsysteem. Zo zagen we na twee(!) selectiemomenten dat de NAb-selectielijnen verschilden in hun specifieke antilichaam-vorming als gevolg van immunisatie. Na verdere selectie (dus meerdere generaties) is een dergelijk effect naar verwachting sterker en zullen andere immunologisch componenten ook meer verschillen. Dergelijke effecten zijn ook waargenomen in een eerder selectie-experiment in kippen op basis van specifieke antilichamen tegen SRBC. De hoge SRBC-selectielijn had vergeleken met de lage SRBC-selectielijn een verhoogde concentratie van CD4+ T-cellen en (CD20+) B-cellen, verlaagde concentratie van CD8+ T-cellen en γ/δ T-cellen, een grotere milt en Bursa van Fabricius, een kleiner lichaamsgewicht, maar meer vet, hogere NAb-niveaus en een verhoogde (klassieke en alternatieve) complement reactiviteit. Deze verschillen leidden niet tot een verschil in een beschermd effect tegen de Ziekte van Marek (uitgelezen als mortaliteit). Hoewel effecten tussen de beide selectie-experimenten tot op zekere hoogte gelijk verwacht werden, blijkt in de praktijk dat de hoge NAb-selectielijn juist zwaarder is dan de lage NAb-selectielijn en dat de hoge NAb-selectielijn een lagere mortaliteit heeft dan de lage NAb-selectielijn als gevolg van een *E. coli*-infectie. Dit suggereert dat het NAb-selectie-experiment, waarin gefokt wordt op een belangrijk onderdeel van zowel het innate als het adaptieve immuunsysteem, duidelijk anders is dan het SRBC-selectie-experiment waarin gefokt werd op de humorale tak van het adaptieve immuunsysteem. Met dit projectvoorstel willen we meer inzicht krijgen in de gevolgen van KLH-bindende NAb-selectie op andere immunologische componenten.
- Het gevolg van selectie op *E. coli*-ziekteresistentie: Eerder zagen we dat de hoge NAb-selectielijn veel minder bevattelijk is voor *E. coli*-luchtweginfectie dan de lage NAb-selectielijn. Verdere karakterisering van ziekteresistentie is wenselijk om te bepalen hoe belangrijk de rol is van NAb in deze en andere infecties. Gedacht kan worden aan luchtweg- of darminfecties met een andere pathogeen dan de *E. coli*-bacterie. Maar gekozen is voor een zelfde *E. coli*-luchtweginfectie, maar nu met een lagere concentratie *E. coli*. Dit is meer gelijkend op een natuurlijk verloop van luchtweginfectie (slechts enkele ziekteverwekkers) t.o.v. het eerder uitgevoerde infectie-experiment waarbij zeer veel ziekteverwekkers werden ingebracht. Dit geeft tevens een bevestiging (ofwel een herhaling) van

eerder waargenomen resultaten. Het kiezen van een ander pathogeen heeft daarnaast als nadeel dat het model moet worden opgezet (uitvoeren pilotexperiment) en dat een dergelijk model ook beschikbaar moet zijn (aanwezigheid van een expert in Nederland).

De te gebruiken kippen zijn op relatief korte termijn beschikbaar: De dieren zijn onderdeel van het doorlopende selectie-experiment generatie vijf tot en met acht. Het generatie-interval is 35 weken. De meeste vragen kunnen worden onderzocht met de ouderdieren en/of de reserve-ouderdieren na het fokken van een nieuwe generatie. Op deze manier worden dieren (met licht ongerief) hergebruikt en reduceert dit het totaal aantal proefdieren.

3.3 Belang

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

Dit project dient de volgende wetenschappelijke belangen:

- kennis over het gevolg van de toegepaste selectie op NAb-niveaus.
- kennis over het gevolg van de toegepaste selectie op andere immunologische parameters.
- kennis van relaties tussen NAb-niveaus, morbiditeit, mortaliteit, infectieresistentie, specifieke immuunreacties (bijvoorbeeld tegen vaccins) en andere immunologische parameters.
- validatie van gen-regio's geassocieerd met NAb of andere immunologische parameters (bijvoorbeeld *E. coli*-resistentie).
- kennis over de immunologische en moleculaire kenmerken van KLH.

De kippen uit het selectie-experiment worden getypeerd voor NAb-niveaus tegen verschillende antigenen, voor NAb-niveaus op verschillende leeftijdsstadia en/of verschillende componenten van het KLH-molecuul (bijvoorbeeld de aanwezige suikergroepen). Daarnaast wordt gekeken naar specifieke antilichamen tegen modelantigenen en/of vaccintiters. Tot slot worden de kippen "immunologisch" gekarakteriseerd door bijvoorbeeld het kwantificeren van CD4+ en CD8+ T-cellen, B-cellen en complement activiteit. De selectielijnen worden tevens getest met een bekend pathogeen. Gekozen is voor *E. coli* op basis van relevantie van het pathogeen voor de pluimveehouderij, beschikbaarheid van het pathogeen (te verkrijgen via de GD) en geschiktheid van het pathogeen in relatie tot het beschermde effect van NAb. Slechts één pathogeen wordt getest binnen dit STW project vanwege tijdslimitatie. Ziekteresistentie tegen dit pathogeen is dus een *proof-of-principle*. Wellicht dat in de toekomst (na afronding van het project) wordt gekeken naar andere pathogenen. Bovendien worden de selectielijnen in een later stadium binnen dit project getest onder praktijkomstandigheden.

Dit project dient de volgende maatschappelijke belangen:

- nieuwe kennis voor de pluimveefokkerij, die gebruikt kan worden in selectie voor ziekteresistentie. Verkregen kennis kan ook worden toegepast voor de gehele veehouderij, hoewel recentelijk onderzoek heeft aangetoond dat NAb-niveaus in rundvee en vissen een voorspeller zijn voor een verhoogd risico voor gezondheidsproblemen en dus niet per se voorspellend zijn voor ziekteresistentie. Verschillende NAb vervullen wellicht verschillende functies waarvan binnen pluimvee, maar ook andere diersoorten nog weinig bekend is. Desalniettemin kan onderzoek aan de kippen-NAb-selectielijnen bijdragen aan de kennis over het belang van NAb bij andere diersoorten en bijdragen aan de kennis over de toe te passen selectiestrategie (fokken op hogere dan wel lagere NAb-niveaus).

Als daarnaast uit onderzoek blijkt dat selectie voor NAb-niveaus inderdaad toepasbaar is in de huidige veefokkerij, dan kan dat bijdragen aan:

- verminderde medicatie en antibiotica gebruik in de pluimveehouderij én gezondere kippen.
- gereduceerde kosten voor de pluimveehouderij en veiligere werkomstandigheden voor pluimveehouders en medewerkers.
- veiliger producten voor de consument.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

De ruggengraat van dit project is het al goedgekeurde NAb-selectie-experiment generatie vier tot en met acht. Na het fokken van een volgende generatie komen de ouderdieren (vijftig hanen en honderd hennen) en reserve-ouderdieren (vijftig hanen en vierhonderd hennen) beschikbaar voor het hier

aangevraagde project. Enerzijds kunnen de ouderdieren gebruikt worden voor (immunologische) karakterisering van de hoge en lage NAb-selectielijnen d.m.v. immunisatie of bloedafname voor ex vivo testen (celkarakterisering, complement assays, vaccintiters, etc.). Anderzijds kunnen de ouderdieren worden gebruikt voor het fokken van een extra generatie kippen ('schaduwgeneratie'), die gebruikt wordt in een proef. Deze 'schaduwgeneratie' ondergaat een (immunologische) behandeling, waardoor het immuunsysteem (en mogelijk NAb-niveaus) beïnvloed wordt. De proef zou dus de selectie kunnen beïnvloeden en daardoor is het niet mogelijk de proef uit te voeren in een generatie van het selectie-experiment zelf, maar alleen in een 'schaduwgeneratie'. De experimenten worden gecomplementeerd door het gebruik van de ISA controlelijn, die vanaf generatie 5 ook in eigen beheer is. De ISA controle lijn is de ouderlijn waaruit de hoge en lage NAb-selectielijnen zijn gefokt.

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

Voor dit project zijn drie typen dierproeven nodig: "bloedafname kippen", "immunisatie kippen" en "infectie-experiment kippen". De eerste twee typen dierproeven geven meer inzicht in de immunologische veranderingen in de selectielijnen als gevolg van de selectie voor KLH-bindende NAb. Het derde type dierproef geeft meer inzicht in de ziekteresistentie in de selectielijnen als gevolg van de selectie voor KLH-bindende NAb.

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

Het fokken van een volgende generatie van de NAb-selectielijnen staat centraal in dit project. De kippen in het fokproces worden in geen geval gebruikt in een proef die tot verandering van de selectiekenmerken van de individuen en/of de nakomelingen kan leiden. Dit op grond van eerdere berekeningen die duiden op maternale transgenerationele effecten op NAb-niveaus, naast de "klassieke" overerving. Dit houdt concreet in dat bloedafname ("bloedafname kippen") mogelijk is gedurende ieder moment, maar dat immunisatie ("immunisatie kippen") of "infectie-experiment kippen" alleen mogelijk is na voldoende aanfok van een volgende generatie. Een exacte invulling van eventuele behandelingen of bepalingen in de dierproeven passend binnen de hierna beschreven type dierproeven wordt op een later moment besloten op basis van resultaten of ontwikkelingen. Desalniettemin staat de huidige planning van de dierproeven volledig uitgewerkt in deze aanvraag.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Bloedafname kippen
2	Immunisatie kippen
3	Infectie-experiment kippen
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10400	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Wageningen University	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Bloedafname kippen

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In de proef wordt bloed afgenomen ter immunologische karakterisering van de hoge en de lage NAb-selectielijnen en de controlelijn. Witte bloedcellen kunnen worden gebruikt voor karakterisering of om in kweek te zetten met bepaalde behandelingen en vervolgens genexpressie te meten. Daarnaast is histologisch onderzoek mogelijk op de (gekweekte) bloedcellen. Tevens kunnen diverse antilichaamconcentraties worden gemeten.

Primaire uitkomstparameters zijn onder andere antilichaamtiter, celconcentraties/celverhoudingen, genexpressie en complementactiviteit.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Bloed wordt éénmaal van de betreffende kippen afgenomen. Bloedafname vindt plaats uit de vleugelveen. De procedure verloopt als volgt: kip wordt gevangen uit hok of kooi, gefixeerd, geprikt en weer vrij gelaten in het betreffende hok of kooi. De totale procedure duurt ongeveer één minuut. Het totale volume bloed dat wordt afgenomen bedraagt één tot 2,5 milliliter (afhankelijk van de test).

Een kip wordt dus maximaal één keer gebruikt voor een aanvullende test. Testen (en vraagstellingen) zullen zo veel mogelijk gecombineerd worden om het aantal proefdieren tot een minimum te beperken. De gehele populatie kan dus éénmaal extra bemonsterd worden. Dit wordt verondersteld als acceptabel hergebruik van de betreffende kippen, die eerder slechts gering of matig ongerief ondergingen.

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

Het aantal kippen dat nodig is per test is tien-vijftien per lijn. Dit is gebaseerd op statistische methoden (power = 0.8, significantie = 0.05). Op basis van ervaringen is dit aantal in de praktijk ook (bijna) altijd voldoende gebleken. Een biologisch relevante verschil is 1.5-twee titerpunten (= twee-drie keer zo veel

antilichamen). De spreiding (standaarddeviatie) binnen een normale kippenpopulatie is ongeveer 1.5.

B. De dieren

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

De kippen zijn afkomstig van eigen fok op de proefaccommodatie Carus, Wageningen University. Per lijn worden tien-vijftien kippen gebruikt (per test). De levensstadia hangen af van de specifieke vraagstelling, maar de relevantste periodes zijn rond zestien weken leeftijd (dit valt dan samen met het selectiecriterium) en rond de fokperiode op 32 weken leeftijd (dit geeft informatie over mogelijke transgeneratiele effecten).

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☐ Nee, ga door met vraag D.

✓ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

De gebruikte kippen in deze dierproef zijn onderdeel van de hoge of lage NAb-selectielijnen of de controlelijn en hebben gering of matig ongerief ondervonden. Dit wordt verondersteld als acceptabel hergebruik van de betreffende kippen, die eerder slechts gering of matig ongerief ondergingen. Daarbij zijn de NAb-selectielijnen uniek in hun soort en is het niet mogelijk andere dieren te gebruiken dan deze lijnen.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

✓ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging: Voor dit type selectie-experimenten zijn geen alternatieven bekend.

Vermindering: Het statistisch berekende en empirisch bevestigde aantal kippen is minimaal, doch voldoende om verschillen te detecteren.

Verfijning: De gebruikte kippen worden slechts éénmaal gebruikt voor deze additionele bepalingen. Daarnaast is de gebruikte grondhuisvesting (tot zestien weken) van de kippen is groter dan wettelijk voorgeschreven en heeft daarnaast diverse hokverrijking (zaagsel, zitstokken, speeltjes). De individuele huisvesting van de hanen is een 74 cm breed x 45 cm diep x 75 cm hoge kooi plus externe voerbak plus drinknippel met over de hele diepte een zitstok en een bak met zand (voor stofbaden). De individuele huisvesting van de hennen is een 36 cm breed x 45 cm diep x 50 cm hoge kooi plus externe voerbak plus drinknippel en over de hele diepte een zitstok.

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

Voor deze proef zijn geen extra maatregelen getroffen, omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Voor zover bekend zijn waar ook ter wereld geen andere NAb-selectie-experimenten lopend (op basis van literatuur-afwezigheid in Pubmed en Google Scholar en kennis van experts op het gebied van immunogenetica in pluimvee).

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

✓ Nee
☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.
G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest
Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?
✓ Nee > Ga verder met vraag H.
☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.
Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding
Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?
☐ Nee > Ga verder met vraag I.
✓ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?
✓ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.
Het is aannemelijk dat in dit type experiment het toepassen van verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden meer ongerief met zich meebrengt dan dat dit ongerief wegneemt. Daarnaast is het gebruik van verdoving, pijnstilling en/of pijnverlichtingsmethoden mogelijk van invloed op de resultaten (effecten op cellen en verbindingen van het immuunsysteem).
☐ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.
I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen
Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?
Stress als gevolg van de handeling met als mogelijk gevolg tijdelijke verminderde voer- en wateropname. Tijdelijke aanwezigheid van een hematoom na bloedafname.
Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.
Het vangen en fixeren kan leiden tot gestrest zijn voor een beperkte tijd (maximaal twee dagen, meestal enkele minuten op basis van eigen waarnemingen). Een hematoom is vaak het gevolg van een onverwachte beweging van de kip tijdens het bloedprikken, waardoor de ader scheurt.
Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.
De betreffende kippen worden met extra zorg geïnspecteerd tijdens de dagelijks controle. In geval van een hematoom zal deze direct na het bloed afnemen, worden dichtgedrukt voor 10 seconden om de bloeding te stelpen.
J. Humane eindpunten
Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☒ Nee > Ga verder met vraag K.
☐ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.
Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?
K. Classificatie van ongerief
Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.
De bloedafname van de kippen is licht ongerief.

Einde experiment

L. Wijze van doden
Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?
☒ Nee
☐ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.
Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?
☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.
☐ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10400	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Wageningen University	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Immunisatie kippen

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Dit type dierproef bestaat uit twee experimenten (Experiment 2a en 2b).

Experiment 2a:

Deze proef heeft als doel meer inzicht te verkrijgen in de KLH-epitopen. KLH (keyhole limpet hemocyanin) is het zuurstof-transporterende molecuul van de zeeslak *Megathura crenulata*. KLH heeft een moleculaire massa variërend tussen acht en 32 MD. Het is een glycoproteïne en bestaat uit functionele units van ongeveer 50 kD met hoge aanwezigheid van glycanen (suikers). Glycanen zijn zogenaamde pathogeen geassocieerde moleculaire structuren (PAMP). Dit zijn conservatieve structuren, die sterk immuun-stimulerend werken vooral op cellen van het innate immuunsysteem, maar ook B-cellen hebben dergelijke PAMP-receptoren. Glycanen van zowel lichaamseigen als lichaamsvreemde oorsprong faciliteren herkenning en verwijdering van de glycanen en de daaraan gekoppelde componenten, zoals bacteriën en dode cellen. Van NAb is bekend dat deze sterke affiniteit vertonen voor onder meer glycanen. Het lijkt dan ook voor de hand liggend dat KLH-bindende NAb vooral binden aan de glycanen aanwezig in KLH.

De KLH-glycanen kunnen d.m.v. in-vitro-behandeling met PNGase van KLH worden 'afgeknipt'. Voor deze proef immuniseren we kippen met onbehandelde KLH (oKLH) en behandelde KLH (bKLH) (=zonder glycanen). Ex-vivo-werk op eerder verzamelde monsters van de NAb-selectielijnen laat zien dat kippen zwakker reageren tegen bKLH dan tegen oKLH en dat antilichamen dus vooral gericht zouden kunnen zijn tegen de aanwezige suikergroepen. Gezien de verwachte rol van deze glycanen in de binding van KLH en KLH-bindende NAb, verwachten we een zwakkere response op de behandelde KLH dan op de onbehandelde KLH ongeacht lijn-effecten. Dit geeft ons meer inzicht in het belang van glycanen op KLH bij de binding van NAb, maar geeft ook meer inzicht in het algemene belang van glycanen op andere structuren (bijvoorbeeld microbiota of lichaamseigen structuren), die een rol zouden kunnen spelen bij de vorming of activatie van NAb. Daarnaast worden voor dit experiment zowel de hoge en lage NAb-selectielijnkippen geïmmuniseerd,

omdat we lijnverschillen in responsiviteit tegen de verschillende behandelingen verwachten. Door selectie op KLH-bindende NAb is het mogelijk dat we niet alleen selecteren op veel NAb (hoge NAb-selectielijn) of weinig NAb (lage NAb-selectielijn), maar ook op herkenning (affiniteit) van KLH of KLH-structuren. We zouden dus kunnen selecteren op affiniteit van NAb tegen KLH-glycanen. Daarbij onderzoeken we de rol die de glycanen spelen in de vorming van immunologisch geheugen d.m.v. een tweede immunisatie. Glycanen kunnen d.m.v. immunisatie als specifieke antigeen werken voor de vorming van het immunologisch geheugen (tegen glycanen). Glycanen (in hun werking als PAMP) zijn daarnaast ook aspecifieke stimuli voor het zowel het innate als het adaptieve (B- en T-cellen) immuunsysteem via herkenning door 'innate' receptoren als CLEC7A (C-type lectin domain family 7 member A, ook bekend als Dectin-1) of CR3 (complement receptor 3) en kunnen dus aspecifiek werken voor de vorming van immunologisch geheugen. Dit geeft zowel inzicht in de functie van glycanen bij de activatie van het immuunsysteem, alsook inzicht in de lijnverschillen als gevolg van selectie.

De primaire uitkomstparameters van deze proef zijn inzicht in de herkenning van glycanen (in de vorm van glycoproteïnen) door NAb, hoe deze herkenning wordt beïnvloedt door selectie van kippen op NAb, hoe de verschillende NAb-niveaus van invloed zijn op deze herkenning en de rol van de glycaan-bindende NAb in de vorming van immunologisch geheugen.

Experiment 2b:

Deze proef heeft als doel meer inzicht te krijgen in de rol van NAb in het initiëren, ondersteunen en vormen van een adaptieve immunrespons en (immunologisch) geheugen. In een eerdere proef met de NAb-selectielijnen bleek dat de hoge NAb-selectielijn ook op latere leeftijd (ongeveer 34 weken) hogere NAb-niveaus had tegen diverse antigenen dan de lage NAb-selectielijn. Tevens had de hoge NAb-selectielijn een sterkere en sneller specifieke immunrespons dan de lage NAb-selectielijn na immunisatie (gemeten d.m.v. specifieke antilichaamniveaus (SpAb)).

Bij het meten van NAb-niveaus binnen de hoge of de lage NAb-selectielijn, worden soms twee pieken in een frequentieverdeling (histogram) waargenomen waar een normale verdeling (met één piek) wordt verwacht. Het suggereert dat de selectie voor KLH-bindende NAb wellicht niet specifiek is voor één selectiecriterium, maar voor twee of meerdere (bijvoorbeeld het aantal B-cellen en de gevoeligheid van de B-cellen voor externe stimuli). Binnen de selectielijnen bestaat dus grote variatie en wellicht ook een verschil in het (specifieke) immuunsysteem. In deze proef wordt onderzocht of verschillende NAb-niveaus binnen één selectielijn een verschillende immunrespons opwekken binnen de lijnen. Dit geeft ons ook inzicht in de verschillen tussen de twee lijnen en hoe deze lijnen verschillen van de controlelijn.

De primaire uitkomstparameters zijn NAb-titers voorafgaand aan de immunisatie, SpAb titers tijdens de immunisatie, en genexpressie in miltcelweek als indicatie voor geheugenvorming van het adaptieve immuunsysteem.

N.B. De milt bestaat uit grote hoeveelheden lymfocyten en is immunologisch dus zeer interessant.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Experiment 2a:

Deze proef bevat vier behandelingen: hoge NAb-selectielijnkippen geïmmuniseerd met oKLH of bKLH en lage NAb-selectielijnkippen geïmmuniseerd met oKLH of bKLH. De behandeling wordt onder de huid toegediend op dag 0 en dag 35. Na de behandeling wordt wekelijks 1 mL bloed afgenomen uit de vleugelvele. Bloedafname vindt plaats voorafgaand aan de primaire behandeling en wekelijks tot en met acht weken na de primaire behandeling; dus het totale aantal bloedafnamemomenten is negen. Dit karakteriseert de primaire en secundaire antilichaamrespons tegen het toegediende antigeen.

De immunisatie verloopt als volgt: kip wordt gevangen uit hok, gefixeerd, onderhuids inbrengen van de behandeling en weer vrij laten in het betreffende hok. De totale procedure duurt ongeveer één minuut.

De bloedafname verloopt als volgt: kip wordt gevangen uit hok of kooi, gefixeerd, geprikt en weer vrij gelaten in het betreffende hok. De totale procedure duurt ongeveer één minuut.

Experiment 2b:

De populatie kippen binnen één lijn wordt opgedeeld in hoge, gemiddelde of lage NAb-niveaus. Per groep ontvangen de kippen één van de drie behandelingen: negatieve controle (fosfaat gebufferde fysiologische zoutoplossing: PBS), immunisatie met KLH of immunisatie met een ander modelantigen (bijvoorbeeld humaan serum albumine: HuSA). Gekozen is voor twee modelantigenen (en een placebo-controlebehandeling), waarvan één onderdeel is van het selectiecriterium en de andere volledig los staat

van het selectie-experiment en voor zover bekend niet specifiek één onderdeel van het immuunsysteem activeert.

De kippen worden tweemaal geïmmuniseerd voor het opwekken van een primaire (dag 0) en secundaire (dag 35) specifieke immuunrespons. Wekelijks wordt bloed afgenomen vanaf de primaire immunisatie (dag 0) tot het einde van de proef (dag 70). Dit resulteert in elf bloedafnames. Aan het einde van de proef worden de kippen geëuthanaseerd en worden miltcellen geïsoleerd en in kweek gezet.

De immunisatie verloopt als volgt: kip wordt gevangen uit hok of kooi, gefixeerd zodanig dat de trachea openstaat, intratracheaal inbrengen van 0.5 mL behandeling (d.m.v. een kropnaald) en weer vrij laten in het betreffende hok. De totale procedure duurt ongeveer één minuut.

De bloedafname verloopt als volgt: kip wordt gevangen uit hok of kooi, gefixeerd, geprikt en weer vrij gelaten in het betreffende hok of de betreffende kooi. De totale procedure duurt ongeveer één minuut.

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

Het aantal kippen dat nodig is per proefgroep is tien. Dit is gebaseerd op statistische methoden (power = 0.8, significantie = 0.05). Op basis van ervaringen is dit aantal in de praktijk ook (bijna) altijd voldoende gebleken. Een biologisch relevante verschil is 1,5-twee titerpunten (= twee-drie keer zo veel antilichamen). De spreiding (standaarddeviatie) binnen een normale kippenpopulatie is ongeveer 1.5.

B. De dieren

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

Het totaal aantal kippen voor dit type experiment is tweehonderdentwintig kippen. De experimenten worden eenmalig uitgevoerd.

Experiment 2a:

De veertig kippen (bestaande uit de twee NAb-selectielijnen met twee behandelingsgroepen/lijn en tien kippen/behandelingsgroep) zijn afkomstig van eigen fok op de proefaccommodatie Carus, Wageningen University. Per behandeling worden tien hennen gebruikt. De hennen zijn geselecteerde moederdieren uit generatie vier die gebruikt worden voor de fok van generatie vijf. De kippen worden pas gebruikt na succesvol uitbroeden van generatie vijf-dieren.

Experiment 2b:

De honderdtachtig kippen (bestaande uit twee NAb-selectielijnen met drie groepen/lijn en tien kippen/lijngroep) zijn afkomstig van eigen fok op de proefaccommodatie Carus, Wageningen University. Per behandelingsgroep worden tien hennen gebruikt. De hennen zijn willekeurig geselecteerde kippen uit een van de generaties. De kippen worden pas gebruikt na succesvol uitbroeden van de volgende generatie kippen, rond 35 weken leeftijd. Dit omdat de hoge NAb-groep in de hoge NAb-selectielijn en de lage NAb-groep in de lage NAb-selectielijn geselecteerd zijn als moederdieren voor het fokken van de volgende generatie.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☐ Nee, ga door met vraag D.

✓ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

De gebruikte kippen in deze dierproef zijn onderdeel van de hoge of lage NAb-selectielijnen of de controlelijn en hebben gering of matig ongerief ondervonden. Dit wordt verondersteld als acceptabel hergebruik van de betreffende kippen, die eerder slechts gering of matig ongerief ondergingen. Daarbij zijn de NAb-selectielijnen uniek in hun soort en is het niet mogelijk andere dieren te gebruiken dan deze lijnen.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

✓ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk

keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging: Voor dit type selectie-experimenten zijn geen alternatieven bekend.

Vermindering: Het statistisch berekende en empirisch bevestigde aantal kippen is minimaal, doch voldoende om verschillen te detecteren.

Verfijning: De gebruikte grondhuisvesting van de kippen is groter dan wettelijk voorgeschreven en heeft daarnaast diverse hokverrijking (zaagsel, zitstokken, speeltjes).

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

Diverse kooiverrijking wordt toegepast voor de kippen (zaagsel, zitstokken, speeltjes).

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Voor zover bekend zijn waar ook ter wereld geen andere NAb-selectie-experimenten lopend (op basis van literatuur-afwezigheid in Pubmed en Google Scholar en kennis van experts op het gebied van immunogenetica in pluimvee).

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☒ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Het is aannemelijk dat in dit type experiment het toepassen van verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden meer ongerief met zich meebrengt dan dat dit ongerief wegneemt.

Daarnaast is het gebruik van verdoving, pijnstilling en/of pijnverlichtingsmethoden mogelijk van invloed op de resultaten (effecten op cellen en verbindingen van het immuunsysteem).

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Stress als gevolg van de handeling (immunisatie of bloedafname) met als mogelijk gevolg tijdelijke verminderde voer- en wateropname.

Tijdelijke aanwezigheid van een hematoom na bloedafname.

Pikkerij als gevolg van groepshuisvesting.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het vangen en fixeren kan leiden tot gestrest zijn voor een beperkte tijd (maximaal twee dagen, meestal enkele minuten op basis van eigen waarnemingen).

Een hematoom is vaak het gevolg van een onverwachte beweging van de kip tijdens het bloedprikken, waardoor de ader scheurt.

Pikkerij is relatief vaak voorkomend, schadelijk gedrag tussen hokgenoten. Een exacte achterliggende oorzaak is niet bekend, hoewel het deels genetisch bepaald is. Van de basislijn is bekend dat zij gevoelig zijn voor het ontwikkelen van pikkerij.

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

De betreffende kippen worden met extra zorg geïnspecteerd tijdens de dagelijks controle.

In geval van een hematoom zal deze direct na het bloed afnemen, worden dichtgedrukt voor 10 seconden om de bloeding te stelpen.

De maatregelen getroffen ter voorkoming dan wel minimalisering van pikkerij: het plaatsen van speeltjes (bos stro, bos touwen), het strooien van graan (eenmaal daags), aanwezigheid van een radio en het ophangen van gasbeton om snavels af te stompen. Eventueel kan nog gevarieerd worden in het moment en de sterkte van de gegeven prikkels. Indien sprake is van (ernstige) pikkerij, dan wordt de lichtintensiteit geminimaliseerd (maximaal 5 lux) en de lichtkleur wordt aangepast naar rood. Dit is een standaard maatregel in de pluimveehouderij. In geval van verenpikkerij wordt het (interne protocol) "Handelingsplan bij pikkerij" in werking gesteld. Dit voorziet in het behandelingen van gepikte kippen en tevens in het eventueel toepassen van HEP op de gepikte kippen.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Intern protocol "Handelingsplan bij pikkerij": Bij constatering van een gewonde kip door pikkerij: behandelen met PBH en CTC spray. Noteren, met diernummer, in het welzijnsdagboek. Kip terugplaatsen in de groep. Kippen met droge wonden worden in principe in de groep gelaten. Bij kippen met een wond groter dan 1 cm of een diepe wond waarbij de onderliggende spieren zichtbaar zijn, geldt het volgende: de kippen worden tweemaal behandeld met de sprays. Als de wond op de derde dag nog steeds nat (en dus vers aangepikt) is, wordt de kip uit het hok verwijderd en in een apart hok gezet. Kippen met wonden waarbij de huid en de spierlaag is geperforeerd, en waarbij de onderliggende buikorganen zichtbaar zijn, worden direct geëuthanaseerd. Kippen die apart zijn gezet blijven controleren, en zo nodig behandelen met PBH en CTC spray. Bij algehele malaise van de kip, of continuering van de pikkerij in de nieuwe groep, wordt de kip in overleg met de onderzoekers alsnog worden geëuthanaseerd.

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

Het percentage kippen dat mogelijk ernstig gepikt wordt (met wondjes), is maximaal 5%.

K. Classificatie van ongerief

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

De immunisaties en bloedafnames van de kippen zijn licht ongerief.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Het doden van de kippen is niet essentieel voor deze proef. Echter de kippen zijn "immunologisch behandeld" en daardoor veranderd en kunnen daarom niet meer dienen voor ander (immunologisch) onderzoek. Optioneel kan wel nog gekeken worden naar het effect van immunisatie op gedragingen, maar dit valt buiten het doel van deze projectaanvraag.

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

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

✓ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10400	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Wageningen University	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		3	Infectie-experiment kippen

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Deze proef geeft meer inzicht in hoeverre NAb een rol spelen in ziekteresistentie tegen bepaalde (opportunistische) infecties. Eerder door ons uitgevoerd onderzoeken suggereerden dat hogere NAb-niveaus bij legpluimvee samen gaan met een hogere overlevingskans van de legperiode en zorgen voor verlaagde mortaliteit op jonge leeftijd als gevolg van een luchtweginfectie met *E. coli*. In deze proef willen we de algemene ziekteresistentie meten van een hoger dan wel lager niveau van NAb (gericht tegen KLH) middels de twee NAb-selectielijnen die gekenmerkt worden door een onderling verschil in NAb-niveaus. De hypothese is dat de hoge NAb-selectielijn minder gevoelig zal zijn voor een infectie in de luchtwegen dan de lage NAb-selectielijn, mogelijk omdat NAb de penetratie of aanhechting van ziekteverwekkers in de luchtzakken hinderen, de spreiding van ziekteverwekkers in het lichaam van de kip hinderen, de vorming van polyserositis in de luchtzakken verminderen, dan wel endotoxines wegvangen. Daarbij testen we de maternale en paternale invloed op ziekteresistentie door het kruisen van hoge NAb-selectielijnhanen met lage NAb-selectielijnhanen (HxL) en van lage NAb-selectielijnhanen met hoge NAb-selectiehanen (LxH). Deze vier genetische verschillende groepen worden gecompleteerd door het gebruik van een controlelijn (WA purebred ISA line). De morbiditeitscores bestaan uit het scoren van *E. coli*-kolonies op de luchtzakken, het pericard en de lever. Daarnaast monitoren we de groei van de kippen en meten we het relatieve orgaangewicht aan het einde van de proef.

Schematisch overzicht dieren

Ouderdieren		Nakomelingen	
Hanen	Hennen		
25 hoge lijn	X 50 hoge lijn	=	hoge lijn
	50 lage lijn	=	HxL
25 lage lijn	X 50 lage lijn	=	lage lijn
	50 hoge lijn	=	LxH
25 controlelijn	X 50 controlelijn	=	controlelijn

Schematisch overzicht *E. coli*-concentraties

Alle concentraties *E. coli*-cultures worden/werden gemaakt vanuit overnacht-*E. coli*-cultures. Het aantal *E. coli*-CFUs (CFU = kolonie-vormende unit) in een dergelijke cultuur is ongeveer 1.0×10^9 /mL. Dit is een standaard dosis met een concentratie van 1.0×10^9 levende *E. coli* bacteriën per mL.

Verdunning	Experiment	CFU/mL	CFU per behandeling (0.2 mL)
Onverdund	Pilotexperiment	1.0×10^9	2.0×10^8
1:5	Infectie-experiment (CCD aanvraag 201521)	2.0×10^8	4.0×10^7
1:10	Pilotexperiment	1.0×10^8	2.0×10^7
1:50	Huidige CCD aanvraag	2.0×10^7	4.0×10^6
1:100	Pilotexperiment	1.0×10^7	2.0×10^6

In deze aanvraag wordt een vijftig maal verdunde *E. coli*-concentratie voorgesteld.

Hypotheses

Op basis van het eerder uitgevoerde pilotexperiment (diverse *E. coli*-concentraties in een pilotexperiment) en het eerder uitgevoerde infectie-experiment (lijnverschillen in mortaliteit) komen we tot de volgende drie hypothesen voor het hier voorgestelde experiment (lijnverschillen in morbiditeit als uitleesparameter voor ziekteresistentie):

1. De hoge NAb-selectielijn is resistentier dan de lage NAb-selectielijn. De controlelijn zit qua resistentie tussen de hoge NAb-selectielijn en de lage NAb-selectielijn. We verwachten een beschermend effect van hogere NAb-niveaus t.g.v. selectie op ziekteresistentie.
2. LxH-kippen hebben een hogere resistentie dan de HxL-kippen. De controlelijn zit qua resistentie tussen de hoge NAb-selectielijn en de lage NAb-selectielijn. We verwachten een additioneel maternaal effect op ziekteresistentie, maar geen additioneel paternaal effect. Eerder onderzoek laat zien dat maternale effecten aanwezig zijn op NAb-niveaus. Voor de hier voorgestelde proef betekent dat de LxH-kippen, kippen met een lage NAb-selectielijnvader met een hoge NAb-selectielijnmoeder, resistentier zijn dan HxL-kippen, kippen met een hoge NAb-selectielijnvader met een lage NAb-selectielijnmoeder. Dit verschil is het gevolg van hoge-NAb-selectielijn-maternale effecten, die een positief effect hebben op de LxH-kippen en ook als gevolg van lage-NAb-selectielijn-maternale effecten, die een negatief effect hebben op de HxL-kippen. De controlelijn heeft geen additionele maternale effecten als gevolg van willekeurige selectie en zit qua resistentie tussen de LxH-kippen en HxL-kippen in.
3. Overall verwachten we dat de rangschikking van gemiddelde morbiditeitscores (als uitleesparameter voor ziekteresistentie) als volgt is (van meer resistent naar minder resistent): hoge NAb-selectielijn, LxH-kippen, controlelijn, HxL-kippen en lage NAb-selectielijn.

Primaire uitkomstparameters zijn informatie over ziekteresistentie als gevolg van NAb-selectie en de maternale en paternale invloed op de ziekteresistentie. De ziekteresistentie wordt gemeten als mortaliteit, morbiditeit en (orgaan-)gewichtsverandering.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Tweeduizendvijfhonderd eieren (eigen fok) worden uitgebroed voor het verkrijgen van een 'schaduwgeneratie'. Dit aantal is gebaseerd op het benodigde aantal kippen voor de behandelingsgroepen: in totaal honderd kippen per lijn per behandeling met een sekseverhouding van 1:1. De uitgekomen kippen worden gesekst en krijgen een kuikenmerk. De kippen worden verdeeld over zeven hokken.

Daarnaast worden twee hokken met vijf kippen in de proefruimte gezet als sentineldieren. Deze kippen

krijgen géén behandeling en worden aangehouden tot drie weken leeftijd.

Indien meer kippen per familie aanwezig zijn (naar verwachting ongeveer 900 kippen) dan het benodigde aantal, wordt dit overschot aan kippen aangehouden tot dag 7 in één hok. Op dag 7 worden alle kippen gewogen en worden deze kippen geëuthanaseerd d.m.v. decapitatie. Van de geëuthanaseerde kippen wordt post-mortem bloed afgenomen om de invloed van maternale antilichamen op de ziekteresistentie te meten. Gedurende het experiment ontvangen alle kippen geen vaccinaties, omdat vaccinaties de resultaten beïnvloeden.

De gefokte kippen worden verkregen uit de geselecteerde ouderdieren. Deze ouderdieren (75 hanen en tweehonderdvijftig hennen) worden na afloop van het fokken van een generatie nog vijf weken extra individueel gehuisvest tot uitkomst van de benodigde kippen voor de schaduwgeneratie. Voor het verkrijgen van de nakomelingen wordt het eerder opgestelde kruisingsschema voor het fokken van die generatie gebruikt. Hierdoor zijn de gebruikte hoge en lage NAb-selectielijn kippen in de schaduwgeneratie representatief voor de kippen in het selectie-experiment. Tevens stelt ons dit in staat om genetische informatie te gebruiken bij het analyseren van de resultaten. Voor het verkrijgen van de HxL-kippen en LxH-kippen wordt een extra kruisingsschema opgesteld. Hiervoor worden de geselecteerde hanen gebruikt met de individueel gehuisveste reservehennen van het selectie-experiment.

Naar aanleiding van resultaten uit een eerder pilotexperiment en een eerder uitgevoerd infectie-experiment worden twee behandelingen getest: PBS als sham/placebo-infectie (0.2 ml) en een behandeling met een *E. coli*-dosis in PBS (0.2 ml). Honderd kippen per lijn per dosis worden gebruikt, gebaseerd op de eerder waargenomen spreiding.

Op 8 dagen leeftijd worden de kippen intratracheaal geïnfecteerd met één van de behandelingen. De kippen worden één week gemonitord, waarna de proef wordt beëindigd. Monitoring vindt plaats iedere twee uur gedurende de eerste vier dagen (maar niet om 2:00 uur en 4:00 uur i.v.m. slaaperiode kippen) en iedere acht uur gedurende de laatste drie dagen (0:00 uur, 8:00 uur en 16:00 uur). Van alle kippen wordt gewicht bepaald op de dag van uitkomst, dag 7 (dag vóór de behandeling i.v.m. hoeveelheid werk), vier dagen na de behandeling en bij het beëindigen van de proef. Tevens wordt post-mortem bloed afgenomen voor additionele bloedbepalingen (bepaling van bijvoorbeeld natuurlijke antilichamen tegen KLH, antilichamen gericht tegen *E. coli*-antigen, acute fase-eiwitten). Daarnaast worden de kippen geopend om luchtzakken, lever en pericard te scoren op *E. coli*-infectie (polyserositis) en worden Bursa, lever en milt gewogen.

Op jonge leeftijd (8 dagen) is het aannemelijk dat de bescherming van de kippen tegen een *E. coli*-infectie voor een groot deel mede bepaald wordt door de maternale antilichamen die via de moeder zijn doorgegeven. Om dit te bepalen is het noodzakelijk bloed (1 mL) af te nemen bij de ouderdieren na beëindiging van de raapperiode (en worden de op dat moment in het ei aanwezige maternale antilichamen gemeten).

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

Het uitgangspunt is dat de infectie (morbiditeitscore en verschil in orgaangrootte) tussen de lijnen met 50% wordt verminderd door een lijneffect. Volgens de binomiale verdeling zijn 94 kippen per groep nodig (eenzijdig getoetst) om een afname van infectie met een betrouwbaarheid van 95% en een onderscheidend vermogen van 80% te kunnen aantonen. Honderd kippen worden ingezet om eersteweeksmortaliteit (~3%) en eventueel verlies van kuikenmerken (~1%) op te vangen.

De extra aanfok van kippen is nodig, omdat we de proef gebalanceerd willen opzetten: 1:1 sekseratio. Dat betekent dat we 100 hanen en 100 hennen per lijn nodig hebben, bij voorkeur evenredig verdeeld over alle tomen (= 2 hanen en 2 hennen per toom). In het vorige *E. coli*-experiment hebben we gerekend op 8 uitgekomen kuikens per toom. 16% van de tomen voldeed niet aan de voorkeur om minimaal 2 hennen én 2 hanen te hebben. Dit is een acceptabele afwijking. Minder dan 8 kuikens per toom fokken zal het aantal tomen dat voldoet, naar beneden brengen en de relatieve inbreng van bepaalde tomen of een bepaalde sekse vergroten. Daardoor zouden de gefokte kuikens niet meer representatief zijn voor hun groep en zal de inbreng van bepaalde kippen van te grote invloed op de groepsprestatie.

8 kuikens per hen maal 250 hennen totaal is 2000 eieren. Met een hatchability van 80% is een inleg van 2500 eieren nodig. Dit betekent 10 eieren per hen.

B. De dieren

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

Duizend kippen (tot twee weken leeftijd) van vijf verschillende kruisingen zijn nodig voor dit experiment (alle uit eigen fok). Daarnaast wordt het surplus aan uitgekomen kippen (naar verwachting 900 kippen) aangehouden tot dag 7 voor maternale antilichaambepaling. Voor de in eigen beheer gefokte kippen zijn 75 hanen en tweehonderdvijftig hennen als ouderdieren (ongeveer 35 weken leeftijd) nodig.

Daarnaast worden tien (twee maal vijf) kippen aangehouden tot drie weken leeftijd als sentineldieren.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☒ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

De gebruikte ouderkippen in deze dierproef zijn onderdeel van de hoge of lage NAb-selectielijnen of de controlelijn en hebben gering of matig ongerief ondervonden. Dit wordt verondersteld als acceptabel hergebruik van de betreffende kippen, die eerder slechts gering of matig ongerief ondergingen. Daarbij zijn de NAb-selectielijnen uniek in hun soort en is het niet mogelijk andere kippen te gebruiken dan deze lijnen.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☒ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

In dit experiment wordt specifiek gekeken naar het effect van genetische selectie op een immunologische parameter (niveau van antistoffen gericht tegen KLH) op de weerstand tegen een belangrijke ziekteverwekker bij pluimvee.

Vervanging:

Aangezien het doel van het project is het verbeteren van de gezondheidsstatus van pluimvee middels de productie van antistoffen op basis van selectie, is een lagere diersoort, dan wel een in-vitro-bepaling geen bruikbare optie.

Verfijning:

Het type infectieus agens voldoet in grote mate aan de criteria van weerstand waaraan NAb een (a-)specifieke bijdrage kunnen leveren aan de weerstand. Tevens is dit model al getest in de NAb-selectielijnen en werden duidelijke verschillen gevonden in *E. coli*-mortaliteit tussen de selectielijnen. Nu wordt onderzocht of bij een 'meer realistische' *E. coli*-concentratie (d.w.z. een lagere concentratie) een verschil in morbiditeit wordt gevonden (er wordt geen/een lage mortaliteit verwacht op basis van het eerder uitgevoerde pilotexperiment). Een nog lagere *E. coli*-dosis is weliswaar realistischer, maar het is aannemelijk dat geen tot weinig verschillen in morbiditeitscore worden gevonden (op basis van pilotexperiment).

Naar ons beste weten zijn voor *E. coli*-infecties geen mildere modellen voorhanden; *E. coli*-vaccins zijn niet goed ontwikkeld. Bovendien zou een *E. coli*-vaccinatie, indien al mogelijk, lastig te onderscheiden zijn van het natuurlijk aanwezige niveau van *E. coli*. Dit *E. coli*-infectiemodel berust op een bij vleeskuikens getest en gevalideerd model met een specifieke *E. coli*-stam verantwoordelijk voor problemen bij pluimvee. Dit model werd eerder door ons succesvol getest in legkuikens, waarbij gelijke klinische waarnemingen werden gedaan in de geïnfecteerde kippen t.o.v. vleeskuikens. Andere infectiemodellen zijn minder geschikt of niet beschikbaar voor dit onderzoek. Veldvirussen zijn een te groot risico voor de omgeving. De immuunreactie tegen virale vaccins wordt ook in de selectielijnen bepaald. Bovendien zijn vaccintiters niet per se identiek aan weerstand, omdat antistoffen ingeval van virusinfecties niet identiek hoeven te zijn aan een relevante immuunrespons (bijvoorbeeld cytotoxische T-celreacties) en daarbij vaccindoses kunnen variëren per kip. Een eerder selectie experiment op specifieke antistoftiters tegen SRBC toonde aan dat zeer grote verschillen in specifieke antistoffen (ook tegen virale vaccins) niet leidde tot significante verschillen in weerstand tegen virale infecties. Daarbij veronderstellen we dat natuurlijke antistofniveaus voornamelijk een eerste barrière

vormen tegen infecties met bacteriën.

Vermindering:

Voor dit experiment is het uitgangspunt dat de acute sterfte laag blijft en vooral verschillen in morbiditeitscores worden gevonden. In een eerder pilotexperiment zagen we dat een lagere verdunning van de *E. coli*-cultuur een relatief grote variatie geeft. Dit experiment behoeft dus geen verschillende concentraties ziekteverwekkers, maar kan worden uitgevoerd met één concentratie waarvan het effect geschat kan worden.

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

Tijdens de additionele fokperiode van deze proef zijn geen aanvullende maatregelen getroffen. De schaduwgeneratie wordt de eerste vier dagen na behandeling twee-uurlijks gecontroleerd (maar niet om 2:00 en 4:00 i.v.m. slaaperperiode kippen) en na vier dagen worden de kippen acht-uurlijks gecontroleerd. De controle bestaat uit een individuele controle op opvallend sterk lijden van de kippen: het niet meer in staat zijn om zelfstandig voedsel of water tot zich te nemen, verlamingsverschijnselen of ademhalingsmoeilijkheden en gesloten ogen als humaan eindpunt (zoals beschreven in de literatuur). Kippen die voldoen aan deze waarnemingen zullen uit de proef worden genomen (zie ook "J. Humane eindpunten"). Tevens zullen drinknippels met bakjes lager worden opgehangen achter in de hokken en acht-uurlijks worden gevuld, zodat zieke kippen makkelijker bij water kunnen. In het eerder uitgevoerde experiment bleek dat vooral zieke kippen achter in het hok zaten (d.w.z. zo ver mogelijk van de deur = stress).

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Voor zover bekend zijn waar ook ter wereld geen andere NAb-selectie-experimenten lopend (op basis van literatuur-afwezigheid in Pubmed en Google Scholar en kennis van experts op het gebied van immunogenetica in pluimvee).

Deze proef is eerder deels uitgevoerd met een tienmaal hogere concentratie *E. coli* (CCD aanvraag 201521). In die proef onderzochten we verschillen tussen de hoge NAb-selectielijn, de lage NAb-selectielijn en de controlelijnen m.b.t. mortaliteit. Deze hebben we aangetoond, maar een verschil in morbiditeitscores werd niet aangetoond (alle kippen waren maximaal geïnfecteerd).

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

✓ Nee

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

De hanen en de hennen worden vanaf ongeveer zestien weken leeftijd individueel gehuisvest conform de normale fokprocedure. Voor deze proef zijn geen additionele veranderingen in huisvesting noodzakelijk, maar de ouderdieren worden wel langer individueel gehuisvest. Dit is noodzakelijk om een representatieve generatie voor de hoge NAb-selectielijn, de lage NAb-selectielijn en de controlelijn te fokken, die vergelijkbaar is met generatie 6 (die eerder is uitgebroed met deze kippen). Daarnaast wordt d.m.v. KI voorkomen dat bepaalde kippen een groter aandeel hebben in een bepaalde lijn en daardoor resultaten beïnvloeden als gevolg van reproductiesucces en niet als gevolg van NAb-niveaus. Tot slot worden dezelfde hanen gebruikt voor het fokken van de NAb-selectielijn als voor het fokken van de HxL-kippen en LxH-kippen. Dit zou betekenen (in geval van groepshuisvesting) dat alle kippen bij elkaar zouden moeten zitten, waardoor onderscheid tussen de groepen niet meer mogelijk is. Tijdelijke groepshuisvesting van de kippen tussen de twee KI-periodes is niet mogelijk i.v.m. de te verwachte agressie bij de hanen en mogelijk verenpikken bij alle kippen. Daarnaast is het aannemelijk dat de overgang van batterijkooi naar

groepshuisvesting en van groepshuisvesting naar batterijkooi voor grote stress zorgt en daarbij zijn mogelijk effecten van huisvestingswisseling en stress niet (goed) bekend. In de hier voorgestelde proefopzet is dus mogelijk sprake van additionele nadelige effecten op het dierenwelzijn, maar er is geen sprake van opschaling van het ongerief voor de ouderdieren.

De gebruikte kippen bij de daadwerkelijk infectie (de nakomelingen) worden gehouden conform de richtlijnen.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☒ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Het gebruik van verdoving, pijnstilling en/of pijnverlichtingsmethoden mogelijk van invloed op de resultaten (effecten op cellen en verbindingen van het immuunsysteem).

De kippen worden frequent gemonitord en indien nodig uit de proef genomen op basis van eerder gedefinieerde humane eindpunten, waardoor het onnodig lijden tot een minimum wordt beperkt.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Stress als gevolg van de handeling (bloedafname bij de ouderdieren of immunisatie bij de schaduwgeneratie) met als mogelijk gevolg tijdelijke verminderde voer- en wateropname.

Tijdelijke aanwezigheid van een hematoom na bloedafname bij de ouderdieren.

Ziekteverschijnselen (koorts, gewichtsverlies, afwijkend gedrag, e.d.; zie ook "J. Humane eindpunten") na *E. coli*-behandeling bij de schaduwgeneratie.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het vangen en fixeren kan leiden tot gestrest zijn voor een beperkte tijd (maximaal twee dagen, meestal enkele minuten op basis van eigen waarnemingen).

Een hematoom is vaak het gevolg van een onverwachte beweging van de kip tijdens het bloedprikken, waardoor de ader scheurt.

Ziekteverschijnselen zijn als gevolg van de *E. coli*-besmetting. Zodra de besmetting aanslaat, zullen de ziekteverschijnselen zichtbaar worden. Ziekteverschijnselen zullen meer aanwezig zijn en sterker worden naar mate de *E. coli*-infectie zich manifesteert.

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

De betreffende kippen worden met extra zorg geïnspecteerd tijdens de dagelijks controle.

In geval van een hematoom zal deze direct na het bloed afnemen, worden dichtgedrukt voor 10 seconden om de bloeding te stelpen.

De schaduwgeneratie wordt de eerste vier dagen na behandeling twee-uurlijks gecontroleerd (maar niet om 2:00 en 4:00 i.v.m. slaaperiode kippen) en na vier dagen worden de kippen acht-uurlijks gecontroleerd. De controle bestaat uit een individuele controle op opvallend sterk lijden van de kippen: het niet meer in staat zijn om zelfstandig voedsel of water tot zich te nemen, verlamingsverschijnselen of ademhalingsmoeilijkheden en gesloten ogen als humaan eindpunt (zoals beschreven in de literatuur). Kippen die voldoen aan deze waarnemingen zullen uit de proef worden genomen (zie ook "J. Humane eindpunten"). Tevens zullen drinknippels met bakjes lager worden opgehangen achter in de hokken en acht-uurlijks worden gevuld, zodat zieke kippen makkelijker bij water kunnen. In het eerder uitgevoerde experiment bleek dat vooral zieke kippen achter in het hok zaten (d.w.z. zo ver mogelijk van de deur = stress).

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In geval van ernstig lijden als gevolg van geen/te weinig voer- of wateropname of als gevolg van infectie, wordt de kip geëuthanaseerd.

De schaduwgeneratie wordt de eerste vier dagen na behandeling twee-uurlijks gecontroleerd (maar niet om 2:00 en 4:00 i.v.m. slaaperiode kippen) en na vier dagen worden de kippen acht-uurlijks gecontroleerd. De controle op humane eindpunten, zoals eerder uitgevoerd bij de vorige infectie-experimenten, bestaat uit een controle op opvallend sterk lijden van de kippen (zoals beschreven in de literatuur):

- het niet meer in staat zijn om zelfstandig voedsel of water tot zich te nemen,
- verlamingsverschijnselen of
- ademhalingsmoeilijkheden en gesloten ogen.

Kippen die voldoen aan minimaal twee van deze waarnemingen worden genoteerd. Indien deze kippen langer dan één dag deze verschijnselen continu vertonen, worden de kippen uit de proef genomen. Het eerder uitnemen van kippen (vóór het vertonen van alle verschijnselen of korter dan één dag met twee of meer verschijnselen) is niet gewenst, omdat juist de duur en manifestatie van de infectie de verwachte lijnverschillen geeft in morbiditeitsscore. Het eerder uitnemen van de kippen resulteert in het scheeftrekken van de resultaten en zorgt mogelijk voor het verkleinen dan wel uitblijven van verschillen. De intratracheale challenge (handeling) resulteert naar verwachting in gering ongerief. Het ontwikkelen van de *E. coli*-infectie gaat, naar mate de infectie zich manifesteert, gepaard met een toenemende mate van ongerief. Matig ongerief wordt verwacht als het dier ziek is, d.w.z. bovenstaande symptomen in een meer of mindere mate laat zien. Er is sprake van (oplopend) matig-ernstig ongerief indien het dier meerdere symptomen laat zien voor een aantal opeenvolgende controles. Ernstig ongerief is aanwezig (tot kort voor) het vaststellen van het bereiken van de humane eindpunten. Met grote zekerheid kan worden verwacht dat de maximale morbiditeitsscore bereikt wordt, als de kippen alle HEP-verschijnselen laten zien, dan wel twee of meer van deze verschijnselen langer dan een dag laten zien. Dit werd waargenomen in het eerder uitgevoerde infectie-experiment. Op dat moment kunnen de kippen uit de proef worden genomen, omdat langer lijden niet ethisch verantwoord is en daarnaast goed bruikbare observaties zijn genoteerd of worden genoteerd tijdens het aanvullende post-mortem onderzoek op een later tijdstip.

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

Maximaal 10%.

K. Classificatie van ongerief

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

Het ongerief voor alle ouderdieren is matig ongerief. Naar verwachting zullen geen kippen uit de ouderdierengroep worden genomen i.v.m. het beschreven ongerief. De hergebruikte kippen met matig ongerief, worden individueel gehuisvest voor vijf weken, worden vijf maal gebruikt voor KI en worden gebruikt voor eenmaal bloed afname.

Het ongerief van het surplus aan uitgekomen kippen wordt geschaald op licht ongerief. De kippen ondergaan twee weegmomenten.

Het ongerief van de met PBS-“geïnfecteerde” kippen wordt geschaald op licht ongerief. Naar verwachting zullen geen kippen uit de PBS-“geïnfecteerde”-diergroep worden genomen i.v.m. het beschreven ongerief. De kippen ondergaan vier weegmomenten en een intratracheale toediening met PBS.

Het ongerief van de met *E. coli*-geïnfecteerde kippen wordt geschaald op ernstig ongerief, maar zou in de praktijk lager kunnen uitvallen en/of kunnen variëren tussen licht tot ernstig ongerief (afhankelijk van de capaciteit van de kip om met de infectie om te gaan). Kippen worden mogelijk uit de proef gehaald volgens de gedefinieerde HEP, maar deze kippen ondergaan dan al ernstig ongerief. De kippen ondergaan vier weegmomenten en een intratracheale toediening met *E. coli*.

Na afloop van het experiment wordt het ongerief vastgelegd, geëvalueerd en gerapporteerd aan de IvD Wageningen. Indien nodig worden ook interne protocollen aangepast en/of geoptimaliseerd.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Het doden van de kippen is essentieel voor deze proef, omdat de organen gewogen en beoordeeld worden voor metingen m.b.t. morbiditeit.

Het is niet noodzakelijk de ouderdieren te doden en deze kunnen in een ander experiment worden hergebruikt.

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

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

✓ Ja

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD104002015357
2. Titel van het project: Consequences of divergent selection for natural antibodies in chicken
3. Titel van de NTS: Gevolgen van selectie voor hoge en lage natuurlijke weerstand in kippen
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
DEC Wageningen-UR

6. Adviestraject
Dit project heeft een wat afwijkend traject doorlopen. Het is in eerste instantie rechtstreeks bij de DEC WUR ingediend. Daarna is het opnieuw bij via de CCD bij de DEC ingediend. De DEC heeft het van de CCD ontvangen op 30 december 2015. Het is tweemaal door de DEC besproken: op 14-12-2015 en op 18-01-2016. De indiening bij de CCD wordt als maatgevend beschouwd voor de te hanteren termijnen.
Aanvraag compleet: ja
Termijnonderbreking(en) van 20-01-2016 tot 25-01-2016:
Aanpassing aanvraag: 25-01-2016
Advies aan CCD: 02-02-2016
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
8. Correspondentie met de aanvrager
Datum vragen: resp. 19-12-2015 (n.a.v. aanmelding bij DEC WUR) en 20-01-2016 (n.a.v. aanmelding CCD)
Strekking van de vragen:
M.b.t. het projectvoorstel:
 - De meerwaarde van dit project t.o.v. een eerder uitgevoerd, vergelijkbaar project;
 - Toelichting op de concrete focus van het project/ het bredere perspectief van het project en over de vraag, hoe de gekozen opzet past in dit bredere perspectief;
 - Vraag m.b.t. kennis van literatuur m.b.t. bevindingen in vergelijkbaar onderzoek bij andere diersoorten en welke conclusies daaruit worden getrokken voor de projectopzet;
 - Een redactionele opmerking.
M.b.t. de appendix 1:
 - Een redactionele opmerking m.b.t. verheldering van verwijzingen naar andere proeven en het toespitsen van de tekst op de voorliggende proef.
M.b.t. Appendix 2:
 - Verheldering en argumentatie van de toegepaste behandelingen van de manier waarop met de gekozen proefopzet het beoogde doel wordt bereikt.
 - Een redactionele opmerking m.b.t. verheldering van verwijzingen naar andere proeven en het toespitsen van de tekst op de voorliggende proef;
 - Enkele tekstuele opmerkingen (ter correctie/ verheldering).

M.b.t. Appendix 3:

- Toelichting op de gekozen dosis van de Coli-cultuur in relatie tot het te verwachten resultaat en explicitering van een hypothese;.
- Toelichting op en verheldering van de noodzaak tot een afwijkende huisvesting;
- Nauwkeuriger beschrijving van de humane eindpunten (HEPs), mede in relatie tot het voorkomen van ernstig ongerief;
- Enkele tekstuele opmerkingen (ter correctie/ verheldering).

M.b.t. de niet-technische samenvatting:

- Enkele tekstuele opmerkingen (ter verheldering).

Datum antwoorden: 25-01-2016

De antwoorden hebben geleid tot adequate aanpassing van de aanvraag.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

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 doelcategorieën in overeenstemming zijn met de hoofddoelstellingen.
3. Het substantiële belang van het project wordt door de DEC onderschreven, gezien de gezondheidssimpact van de E.coli bij pluimvee en gegeven het feit, dat het veel voorkomt en er veel pluimvee wordt gehouden. Ook bij minder intensieve houderijsystemen komt het voor, is er gezondheidswinst te behalen. Als met genetische selectie kan worden bereikt, dat de weerstand verbetert kan dat grote implicaties hebben, mogelijk ook voor andere diersoorten, niet alleen voor wat betreft de gezondheid, maar ook voor antibioticagebruik en ontwikkeling van bacteriële resistentie.
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. Het wetenschappelijke doel is om informatie te vergaren over de relatie tussen natuurlijke antilichamen en E.Coli-(on)gevoeligheid. De betrokken onderzoeksgroep heeft veel ervaring met dit type onderzoek, waar het voorliggende project op voortbouwt. Bovendien is hiervoor een pilot uitgevoerd, waarvan de resultaten zijn gebruikt in deze opzet.
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: Er worden ouderdieren gebruikt uit een andere proef. T.b.v. voorliggend project moeten ze langer (dan nodig voor de oorspronkelijke proef) individueel worden gehuisvest. Dit wordt voldoende onderbouwd. In de hier voorgestelde proefopzet is dus mogelijk sprake van additionele nadelige effecten op het dierenwelzijn, maar er is geen sprake van opschaling van het ongerief voor de ouderdieren.
6. De DEC stelt vast dat het cumulatieve ongerief realistisch is ingeschat. De verwachte negatieve gevolgen variëren per type proef. In het algemeen zijn de negatieve gevolgen licht, bijvoorbeeld twee vaccinatieprikken en acht keer bloedafname. Dit kan leiden tot lichte pijn en stress met als mogelijk gevolg tijdelijke verminderde voer- en

wateropname, daarnaast mogelijk tijdelijke aanwezigheid van een hematoom na bloedafname. Bij het infectie-experiment zijn de negatieve gevolgen licht tot ernstig. Dit kan leiden tot het overlijden van de dieren als gevolg van de infectie, maar zal vooral zichtbaar zijn als malaise, pijn, stress, gewichtsverlies, mogelijk ook ademhalingsmoeilijkheden en verlamingsverschijnselen. Ook worden sommige kippen individueel gehouden wat stress met zich meebrengt, omdat de dieren niet veel afleiding hebben. Bij de dieren die in groepen worden gehouden kan sprake zijn van verenpikkerij.

7. De DEC heeft vastgesteld dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Het doel van het project is het verbeteren van de gezondheidsstatus van pluimvee middels de hogere productie van natuurlijke antistoffen op basis van selectie. De gebruikte kippen zijn onderdeel van een speciaal fokprogramma voor kippen met hoge of lage niveaus van natuurlijke antilichamen. Een lagere diersoort dan wel een in-vitro-bepaling is geen bruikbare optie.
8. De DEC heeft vastgesteld dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van gebruik van dieren voor dierproeven. Het statistisch berekende en empirisch bevestigde aantal kippen is minimaal, doch voldoende om verschillen te detecteren. Daarnaast is voor het bepalen van het aantal dieren voor de infectieproef gebruik gemaakt van de resultaten van een pilot, waaruit bleek dat het experiment kan worden uitgevoerd met één concentratie waarvan het effect geschat kan worden. De aanvrager beschikt over voldoende expertise om te voorkomen dat eerder gedaan onderzoek herhaald wordt.
9. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De kippen, die worden gehuisvest in groepen, worden gehouden op zaagsel, met zitstokken en hebben beschikking over 'speeltjes' tegen eventuele verveling. Verenpikken wordt zoveel mogelijk voorkomen of behandeld. Daarnaast worden voor alle dieren altijd de beschreven humane eindpunten gehanteerd en wordt met extra zorg gecontroleerd als de dieren mogelijk ernstig gaan lijden. Alle hennen die alleen worden gehouden, hebben een buurvrouw die ze kunnen zien, horen, ruiken en aanraken. De meeste hanen die alleen worden gehouden, hebben een buurman die ze kunnen zien, horen, ruiken en aanraken. Sommige hanen hebben geen directe buurman, maar kunnen wel andere hanen zien, horen en ruiken. Daarbij hebben alle hanen een stofbad in de kooi om een stofbad te kunnen nemen. De DEC is overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
10. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
11. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7.

D. Ethische afweging

De DEC is unaniem 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 een beter begrip van de selectie op natuurlijke antistoffen (bij de hoge en lage natuurlijke-antilichaamkippenlijnen) en de kennis over ziekteweerstand, die direct kan worden toegepast door fokbedrijven. Op termijn kan dit bijdragen aan vermindering van antibioticagebruik en verbetering van de gezondheid en het welzijn van dieren en mensen. 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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen-Universiteit

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD104002015357

Bijlagen

2

Datum 28 december 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 23 december 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD104002015357. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10400
Naam instelling of organisatie: Wageningen-Universiteit
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 9215846
Straat en huisnummer: Akkermaalsbos 12
Postbus: 59
Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN
IBAN: NL10RABO0397066465
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Wageningen UR

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]

Functie: [REDACTED]

Afdeling: [REDACTED]

Telefoonnummer: [REDACTED]

E-mailadres: [REDACTED]

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 januari 2016

Geplande einddatum: 31 december 2020

Titel project: Consequences of divergent selection for natural antibodies in chicken

Titel niet-technische samenvatting: Gevolgen van selectie voor hoge en lage natuurlijke weerstand in kippen

Naam DEC: DEC Wageningen University

Postadres DEC: Postbus 9101, 6700 HB 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: 23 december 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen-Universiteit



Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD104002015357

Bijlagen

2

Datum 28 december 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 28 december 2015

Vervaldatum: 27 januari 2016

Factuurnummer: 15700357

Ordernummer: WUR922946

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD104002015357	€ 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

Wageningen University

Postbus 59
6700 AB Wageningen

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD104002015357

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
1

Datum 09 februari 2016

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 23 december hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Consequences of divergent selection for natural antibodies in chicken" met aanvraagnummer AVD104002015357. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

1) Wij begrijpen dat u in bijlage 1 en 3 zowel hanen als hennen gebruikt, terwijl u in bijlage 2 enkel hennen gebruikt. Kunt u bevestigen dat u in bijlage 1 en 3 beide geslachten gebruikt? En kunt u onderbouwen waarom u in bijlage 2 alleen hennen gebruikt?

2) Het aantal te gebruiken dieren in de NTS lijkt niet overeen te komen met het aantal te gebruiken dieren beschreven in de aanvraag.

3) Kunt u het totale aantal te gebruiken dieren in bijlage 1 verhelderen? U noemt een aantal van 10-15 dieren per test, maar niet hoeveel testen u zult uitvoeren.

4) U geeft aan dat de dieren worden hergebruikt, en in bijlage 3 mogelijk ernstig ongerief ondervinden. Bij vraag C heeft u echter aangegeven dat er geen sprake is van (of een risico van) ernstig ongerief. Kunt u dit consistent maken?

Overige opmerkingen

Het is ons niet volledig helder wat de handelingen zijn geweest met de dieren voordat ze in de onderliggende dierproef worden gebruikt. Mogelijk is hier geen sprake van hergebruik, indien de dieren voor identificatie/karakterisering slechts 1 ingreep nodig is (zie hiervoor het registratieboekje van de NVWA).

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

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

Datum

09 februari 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD104002015357

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

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

1 Uw gegevens

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

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- | | |
|--------------------------|--|
| ☐ | |
| ☐ | |
| ☐ | |

3 Ondertekening

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

Postbus 338 | 6700 AH Wageningen

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Geachte heer/mevrouw,

Hieronder vindt u mijn reactie op uw verzoek (d.d. 9 februari 2016) tot opheldering omtrent enkele onduidelijkheden in project "Consequences of divergent selection for natural antibodies in chicken" met aanvraagnummer AVD104002015357.

M.b.t. "Onduidelijkheden":

1) Wij begrijpen dat u in bijlage 1 en 3 zowel hanen als hennen gebruikt, terwijl u in bijlage 2 enkel hennen gebruikt. Kunt u bevestigen dat u in bijlage 1 en 3 beide geslachten gebruikt? En kunt u onderbouwen waarom u in bijlage 2 alleen hennen gebruikt?

Dit is correct. In bijlage 1 en bijlage 3 worden zowel hennen als hanen gebruikt. In bijlage 2 worden alleen hennen gebruikt.

De huidige structuur m.b.t. het fokken van de NAb-selectielijnen is dat de niet-geselecteerde hanen worden geëuthanaseerd na het selectiemoment (zestien weken leeftijd), omdat langer aanhouden van de dieren niet mogelijk is i.v.m. verwachte agressie in groepshuisvesting en omdat individuele huisvesting van alle hanen niet gewenst is. Alleen selectiehanen kunnen dus (individueel) aangehouden worden. De handelingen uit bijlage 1 kan op alle dieren worden uitgevoerd zonder consequenties voor het selectie criterium en de fokprocedure. De handelingen, c.q. immunisaties, uit bijlage 2 daarentegen manipuleren het selectie criterium en/of de fokprocedure en kunnen daardoor pas worden uitgevoerd na afloop van de fokperiode (vanaf ongeveer 35 weken leeftijd). Op die leeftijd is het niet mogelijk om hanen in groepshuisvesting aan te houden en is het ongewenst deze hanen langer individueel gehuisvest aan te houden. De hanen zijn daardoor niet bruikbaar voor het experiment uit bijlage 2. De beschreven dieren uit bijlage 3 zijn een 'extra' generatie dieren. De handeling, c.q. infectie, uit bijlage 3 beïnvloedt het selectie criterium en/of de fokprocedure. Om deze reden kunnen niet de dieren uit de fokgeneratie zelf gebruikt worden, maar wordt een 'schaduwgeneratie' gefokt. Voor dit experiment wordt geen sekseverschil verwacht en kunnen dus zowel hanen als hennen gebruikt worden.

Het gebruik van alleen hennen in bijlage 2 volgt dus uit praktische redenen. Voor bijlage 1 en bijlage 3 kunnen beide sekse gebruikt worden, omdat hier geen verschil in wordt verwacht. Tevens halveert dit het aantal te gebruiken proefdieren.

DATUM

10 februari 2016

ONDERWERP

Reactie op "Aanvulling
Aanvraag projectvergunning
dierproeven"

UW KENMERK

Aanvraagnummer
AVD104002015357

ONS KENMERK

Aanvraagnummer
AVD104002015357 - Reply 1

INTERNET

www.wageningenUR.nl

KVK NUMMER

09098104

CONTACTPERSOON

TELEFOON

E-MAIL

2) *Het aantal te gebruiken dieren in de NTS lijkt niet overeen te komen met het aantal te gebruiken dieren beschreven in de aanvraag.*

Hieronder wordt het aantal dieren per experiment weergegeven:

Bijlage	Aantal	Omschrijving
1	20-30 dieren per test	Volwassen dieren a.g.v. de reguliere selectie- en fokprocedure
2a	40 hennen	Geselecteerde hennen na afloop van de selectie- en fokprocedure
2b	180 hennen	Geselecteerde en niet-geselecteerde hennen na afloop van de selectie- en fokprocedure
3	75 hanen	Geselecteerde hanen voor additionele fokprocedure na afloop van de reguliere selectie- en fokprocedure
	250 hennen	Geselecteerde hennen voor additionele fokprocedure na afloop van de reguliere selectie- en fokprocedure
	1.000 dieren	Kuikens voor het infectie-experiment
	900 dieren	Surplus aan kuikens als gevolg van uitkomst
	10 dieren	Sentinel-kuikens voor het infectie-experiment

Het totaal aantal dieren komt uit op 2.905 indien uitgegaan wordt van 15 testen met 30 dieren (zie ook volgende vraag). U heeft correct opgemerkt dat het aantal dieren genoemd in de NTS niet overeenkomt met de aantallen genoemd in de aanvraag. Het aantal dieren in de NTS bevat een foutief, dubbel aantal dieren in het infectie-experiment. In de bijlage van deze brief vindt u de aangepaste NTS. Hierbij is het maximaal aantal dieren bijgesteld naar 3.000 dieren om extra marge aan te houden voor eventuele aanvullende testen onder bijlage 1 en een zeer goede uitkomst voor het infectie-experiment (resultierend in een groter aantal surplus aan kuikens).

3) *Kunt u het totale aantal te gebruiken dieren in bijlage 1 verhelderen? U noemt een aantal van 10-15 dieren per test, maar niet hoeveel testen u zult uitvoeren.*

Het maximaal aantal testen dat kan worden uitgevoerd is 75 testen (1.500 dieren per generatie gedeeld door 20 dieren per test). Naar verwachting zijn ongeveer 15 testen nodig (op bijvoorbeeld twee leeftijdsmomenten). Indien mogelijk worden testen zoveel mogelijk gecombineerd, zodat in totaal minder dieren gebruikt worden. Dit levert tevens additionele informatie op, omdat binnen een individu het immuunsysteem voor meerdere aspecten wordt gekarakteriseerd en gecombineerd. N.B. Dieren worden gebruikt voor één bloedafname. Een dier wordt dus niet gebruikt voor twee of meer herhaalde bloedafnames.

4) *U geeft aan dat de dieren worden hergebruikt, en in bijlage 3 mogelijk ernstig ongerief ondervinden. Bij vraag C heeft u echter aangegeven dat er geen sprake is van (of een risico van) ernstig ongerief. Kunt u dit consistent maken?*

Het hergebruik van dieren in bijlage 3 refereert naar de gebruikte ouderdieren. Deze ouderdieren ondervonden gering of matig ongerief. Deze ouderdieren worden niet gebruikt voor de daadwerkelijke infectie en dus is geen sprake van (kans op) ernstig ongerief.

Hieronder wordt de toelichting op ongerief in de aanvraag kort samengevat:

Vraag	Subvraag	Antwoord	Toelichting
C	Hergebruik?	Nee	Geen hergebruik voor de additioneel gefokte dieren die de daadwerkelijk behandeling ondergaan.
		Ja	Wel hergebruik voor de ouderdieren. Deze dieren zijn eerder gebruikt voor de reguliere selectie- en fokprocedure.
	Ernstig ongerief?	Nee	De hergebruikte ouderdieren ondergaan geen (kans op) ernstig ongerief.
K	Classificatie ongerief:	Matig	Ongerief voor de hergebruikte ouderdieren
		Licht	Ongerief voor het surplus aan kuikens
		Licht	Ongerief voor de kuikens met controlebehandeling
		Ernstig	Ongerief voor de kuikens met <i>E. coli</i> -behandeling

M.b.t. "Overige opmerkingen":

Het is ons niet volledig helder wat de handelingen zijn geweest met de dieren voordat ze in de onderliggende dierproef worden gebruikt. Mogelijk is hier geen sprake van hergebruik, indien de dieren voor identificatie/karakterisering slechts 1 ingreep nodig is (zie hiervoor het registratieboekje van de NVWA).

De dieren worden gebruikt voor het fokken op algemene ziekteresistentie. Kort samengevat ondergaan dieren minimaal twee en maximaal vier bloedafnames, wordt ongeveer 15% individueel gehuisvest voor ongeveer vijftien weken en wordt ongeveer 5% gebruikt voor KI. Daarnaast worden alle dieren vierwekelijks gewogen. Dit resulteert in gering of matig ongerief voorafgaande aan experimenten uit deze aanvraag en dus is sprake van hergebruik van dieren.

Ik hoop u hiermee voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,

**Bijlage:**

- Melding Bijlagen via de post
- NTS AVD104002015357.def_v2.docx

DATUM

10 februari 2016

ONS KENMERK

Aanvraagnummer

AVD104002015357 - Reply

1

PAGINA

3 van 3



Melding

Bijlagen via de post

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

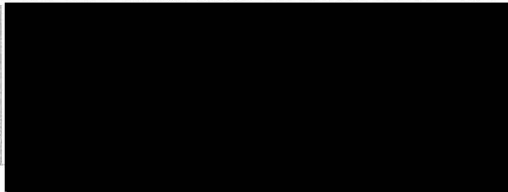
1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- | | | | |
|----------------|---|------------|---|
| Naam aanvrager |  | | |
| Postcode |  | Huisnummer |  |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.
- | | |
|----------------|-----------------|
| Aanvraagnummer | AVD104002015357 |
|----------------|-----------------|

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.
- | | |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| ☒ | NTS AVD104002015357.def_v2.docx |
| ☐ | |
| ☐ | |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- | | |
|--------------|--|
| Naam |  |
| Datum | 10 - 02 - 2016 |
| Handtekening |  |

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen-Universiteit

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



Centrale Commissie

Dierproeven

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD104002015357

Datum 22 FEB 2016

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 23 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Consequences of divergent selection for natural antibodies in chicken" met aanvraagnummer AVD104002015357. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel.

U kunt met uw project "Consequences of divergent selection for natural antibodies in chicken" starten. De vergunning wordt afgegeven van 22 februari 2016 tot en met 31 december 2020.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC Wageningen University. Dit advies is opgesteld op 2 februari 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. De CCD stelt wel algemene voorwaarden aan dit project.

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

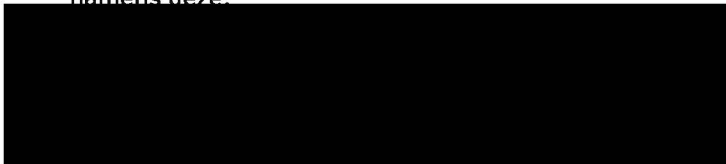
<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

**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: Wageningen-Universiteit

Adres: Postbus 59

Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN

Deelnemersnummer: 10400

deze projectvergunning voor het tijdvak 22 februari 2016 tot en met 31 december 2020, voor het project "Consequences of divergent selection for natural antibodies in chicken" met aanvraagnummer AVD104002015357, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen University.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 23 december 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 11 februari 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 11 februari 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 2 februari 2016, ontvangen op 2 februari 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Bloedafname kippen	Kippen / eigen fok	450	Licht / mild	
Immunisatie kippen	Kippen / eigen fok	220	Licht / mild	
Infectie-experiment kippen	Kippen / eigen fok	2235	Ernstig / severe	
Marge	Kippen / eigen fok	95	Licht / mild	

Voorwaarden

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

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.

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom van beoordeling achteraf voorzien.

Deze beoordeling zal uiterlijk december 2021 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van de dierproeven conform de vergunning waren.

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.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.

Van: Info-zbo
Verzonden: vrijdag 26 februari 2016 15:13
Aan: 'DEC'
Onderwerp: Terugkoppeling aanvraag AVD104002015357

Geachte DEC,
Enige tijd geleden heeft u de CCD van een advies voorzien betreffende aanvraag AVD104002015357 (Consequences of divergent selection for natural antibodies in chicken). Onze dank voor uw heldere en goed onderbouwde advies.

Wij hebben de aanvrager nog om aanvullende informatie gevraagd. Het ging om de volgende vragen:

- 1) Wij begrijpen dat u in bijlage 1 en 3 zowel hanen als hennen gebruikt, terwijl u in bijlage 2 enkel hennen gebruikt. Kunt u bevestigen dat u in bijlage 1 en 3 beide geslachten gebruikt? En kunt u onderbouwen waarom u in bijlage 2 alleen hennen gebruikt?
- 2) Het aantal te gebruiken dieren in de NTS lijkt niet overeen te komen met het aantal te gebruiken dieren beschreven in de aanvraag.
- 3) Kunt u het totale aantal te gebruiken dieren in bijlage 1 verhelderen? U noemt een aantal van 10-15 dieren per test, maar niet hoeveel testen u zult uitvoeren.
- 4) U geeft aan dat de dieren worden hergebruikt, en in bijlage 3 mogelijk ernstig ongerief ondervinden. Bij vraag C heeft u echter aangegeven dat er geen sprake is van (of een risico van) ernstig ongerief. Kunt u dit consistent maken?

Overige opmerkingen

Het is ons niet volledig helder wat de handelingen zijn geweest met de dieren voordat ze in de onderliggende dierproef worden gebruikt. Mogelijk is hier geen sprake van hergebruik, indien de dieren voor identificatie/karakterisering slechts 1 ingreep nodig is (zie hiervoor het registratieboekje van de NVWA).

De aanvrager heeft deze vragen naar tevredenheid beantwoord en enkele kleine onduidelijkheden nog telefonisch toegelicht.

Conform uw advies heeft de CCD dit project vergund, met toevoeging van de volgende voorwaarden:
In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemene 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.

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom van **beoordeling achteraf** voorzien.

Wij danken u nogmaals voor uw heldere en onderbouwde advies.

Deze e-mail is bedoeld ter informatie, u hoeft niets te doen.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven