

|            |                                                                                               |                        |             |               |                          |               |               |               |             |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-------------|---------------|--------------------------|---------------|---------------|---------------|-------------|
|            | <b>Inventaris Wob-verzoek W15-08</b>                                                          |                        |             |               |                          |               |               |               |             |
|            |                                                                                               |                        |             |               |                          |               |               |               |             |
|            |                                                                                               | <b>wordt verstrekt</b> |             |               | <b>weigeringsgronden</b> |               |               |               |             |
| <b>nr.</b> | <b>document</b>                                                                               | <b>reeds openbaar</b>  | <b>niet</b> | <b>geheel</b> | <b>deels</b>             | <b>10.1.c</b> | <b>10.2.e</b> | <b>10.2.g</b> | <b>11.1</b> |
|            | <b>NTS 201562 Ontwikkelen van influenza (griep) vaccins</b>                                   |                        |             |               |                          |               |               |               |             |
| 1          | Aanvraagformulier                                                                             |                        |             |               | x                        |               | x             | x             |             |
| 2          | Projectvoorstel                                                                               |                        |             | x             |                          |               |               |               |             |
| 3          | niet Technische Samenvatting                                                                  | x                      |             |               |                          |               |               |               |             |
| 4          | DEC advies                                                                                    |                        |             |               | x                        |               | x             | x             |             |
| 5          | Niet Technische Samenvatting                                                                  | x                      |             |               |                          |               |               |               |             |
| 6          | mail van onderzoeker dd 23-6-2015                                                             |                        |             |               | x                        |               | x             |               |             |
| 7          | Mail behandelaar aan onderzoeker dd 04-06-2015                                                |                        |             |               | x                        |               | x             |               |             |
| 8          | mail onderzoeker aan behandelaar dd 20-05-2015                                                |                        |             |               | x                        |               | x             |               |             |
| 9          | mail van onderzoeker aan behandelaar dd 08-06-2015, stuk nummer 6 heeft bijna dezelfde inhoud |                        |             |               | x                        |               | x             |               |             |
| 10         | mail behandelaar aan DEC ter informatie dd 05-06-2015                                         |                        |             |               | x                        |               | x             |               |             |
| 11         | mail aan DEC dd 29-06-2015                                                                    |                        |             |               | x                        |               | x             |               |             |
| 12         | beschrijving dieproeven bijlage 1                                                             |                        |             | x             |                          |               |               |               |             |
| 13         | beschrijving dieproeven bijlage 2                                                             |                        |             | x             |                          |               |               |               |             |
| 14         | beschrijving dieproeven bijlage 3                                                             |                        |             | x             |                          |               |               |               |             |
| 15         | beschrijving dieproeven bijlage 4                                                             |                        |             | x             |                          |               |               |               |             |
| 16         | beschrijving dieproeven bijlage 5                                                             |                        |             | x             |                          |               |               |               |             |
| 17         | beschrijving dieproeven bijlage 6                                                             |                        |             | x             |                          |               |               |               |             |
| 18         | beschrijving dieproeven bijlage 7                                                             |                        |             | x             |                          |               |               |               |             |
| 19         | Ambtelijk advies                                                                              |                        | x           |               |                          |               |               |               | x           |
| 20         | Vergunning dd 13 mei 2015                                                                     |                        |             |               | x                        |               | x             | x             |             |
| 21         | ontvangstbevestiging                                                                          |                        |             |               | x                        |               | x             |               |             |



Projectnummer AVD40100201562

## Aanvraag

### Projectvergunning Dierproeven

#### Administratieve gegevens

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

## 1 Gegevens aanvrager

|                                                     |                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                |                                                                                  |                                                     |                             |                    |                   |                |                    |                                       |                   |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------|--------------------|-------------------|----------------|--------------------|---------------------------------------|-------------------|
| 1.1                                                 | Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?<br><i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>                          | <input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 40100<br><input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                |                                                                                  |                                                     |                             |                    |                   |                |                    |                                       |                   |
| 1.2                                                 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.                                                                                 | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Naam instelling of organisatie</td> <td>Stichting DLO</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>9 0 9 8 1 0 4</td> </tr> </table>                                                                                                                                            | Naam instelling of organisatie | Stichting DLO                                                                    | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [Redacted]                  | KvK-nummer         | 9 0 9 8 1 0 4     |                |                    |                                       |                   |
| Naam instelling of organisatie                      | Stichting DLO                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                |                                                                                  |                                                     |                             |                    |                   |                |                    |                                       |                   |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [Redacted]                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                |                                                                                  |                                                     |                             |                    |                   |                |                    |                                       |                   |
| KvK-nummer                                          | 9 0 9 8 1 0 4                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                |                                                                                  |                                                     |                             |                    |                   |                |                    |                                       |                   |
| 1.3                                                 | Vul de gegevens van het postadres in.<br><i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Straat en huisnummer</td> <td>Akkermaalsbos 12</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>59</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6700AW Wageningen</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL10RABO0397066465</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>Wageningen UR</td> </tr> </table>                                                     | Straat en huisnummer           | Akkermaalsbos 12                                                                 | Postbus                                             | 59                          | Postcode en plaats | 6700AW Wageningen | IBAN           | NL10RABO0397066465 | Tenaamstelling van het rekeningnummer | Wageningen UR     |
| Straat en huisnummer                                | Akkermaalsbos 12                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                |                                                                                  |                                                     |                             |                    |                   |                |                    |                                       |                   |
| Postbus                                             | 59                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                |                                                                                  |                                                     |                             |                    |                   |                |                    |                                       |                   |
| Postcode en plaats                                  | 6700AW Wageningen                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                |                                                                                  |                                                     |                             |                    |                   |                |                    |                                       |                   |
| IBAN                                                | NL10RABO0397066465                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                |                                                                                  |                                                     |                             |                    |                   |                |                    |                                       |                   |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer               | Wageningen UR                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                |                                                                                  |                                                     |                             |                    |                   |                |                    |                                       |                   |
| 1.4                                                 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.                                                                                                                  | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>Wetenschappelijk medewerker</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>CVI</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[Redacted]@wur.nl</td> </tr> </table> | (Titel) Naam en voorletters    | [Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. | Functie                                             | Wetenschappelijk medewerker | Afdeling           | CVI               | Telefoonnummer | [Redacted]         | E-mailadres                           | [Redacted]@wur.nl |
| (Titel) Naam en voorletters                         | [Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                |                                                                                  |                                                     |                             |                    |                   |                |                    |                                       |                   |
| Functie                                             | Wetenschappelijk medewerker                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                |                                                                                  |                                                     |                             |                    |                   |                |                    |                                       |                   |
| Afdeling                                            | CVI                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                |                                                                                  |                                                     |                             |                    |                   |                |                    |                                       |                   |
| Telefoonnummer                                      | [Redacted]                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                |                                                                                  |                                                     |                             |                    |                   |                |                    |                                       |                   |
| E-mailadres                                         | [Redacted]@wur.nl                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                |                                                                                  |                                                     |                             |                    |                   |                |                    |                                       |                   |
| 1.5                                                 | (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.                                                                               | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td></td> </tr> </table>                                                                     | (Titel) Naam en voorletters    | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.            | Functie                                             |                             | Afdeling           |                   | Telefoonnummer |                    | E-mailadres                           |                   |
| (Titel) Naam en voorletters                         | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> 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 | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     |                                                            |
| Afdeling                    |                                                            |
| Telefoonnummer              |                                                            |
| E-mailadres                 |                                                            |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- ☐ Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- ☒ Nee

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |                     |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 _ 0 6 _ 2 0 1 5 |
| Einddatum  | 0 1 _ 0 6 _ 2 0 2 0 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Ontwikkeling van influenza (griep) vaccins
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Ontwikkeling van influenza (griep) vaccins
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                              |
|-------------|------------------------------|
| Naam DEC    | DEC-DLO                      |
| Postadres   | Postbus 65, 8200 AB Lelystad |
| E-mailadres | [REDACTED]@wur.nl            |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
- ☐ Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- ☐ Via een eenmalige incasso
- ☒ Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- ☒ Projectvoorstel
- ☒ Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- ☒ ~~Melding Meststoffen~~ Inkooporder WUR851589
- ☒ 7 x Bijlages beschrijving dierproeven, DEC-advies

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

|              |                               |
|--------------|-------------------------------|
| Naam         | [Redacted]                    |
| Functie      | gemandateerd vergunninghouder |
| Plaats       | Wageningen                    |
| Datum        | 11 - 05 - 2015                |
| Handtekening | [Redacted]                    |





## Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.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.

##### Achtergrond:

Influenza zorgt jaarlijks voor epidemieën bij de mens. Dit veroorzaakt ziekte (schattingen variëren van 3-5 miljoen ernstig zieken wereldwijd per jaar) soms met longontsteking, die zo ernstig kan zijn dat er dodelijke slachtoffers te betreuren zijn (sterftecijfer varieert van 250.000 tot 500.000 wereldwijd per jaar). Naast het menselijk lijden, veroorzaakt dit een niet geringe economische schade vanwege b.v. ziekmeldingen en de daarmee samenhangende absentie van werk en de kosten van hospitalisatie. Soms groeien deze epidemieën uit tot een zogenaamde pandemie, waarvan de impact op zowel de volksgezondheid als de economie nog groter is. Er bestaat voor influenza een vaccinatie aanpak. Echter door de genetische variatie van het influenza virus is het nodig om elke jaar, zo kort mogelijk op het vaccinatieseizoen (het najaar voor het noordelijk halfjaar, en het voorjaar voor zuidelijk halfjaar), een nieuw vaccin te ontwikkelen op basis van een schatting/voorspelling door de WHO (Bron: WHO).

De bestaande vaccins bieden bescherming tegen rondgaande influenza stammen, waarvan de WHO inschat dat deze een probleem zullen worden gedurende het jaarlijks griepseizoen. Van tijd tot tijd slaan influenza stammen toe ondanks dat er gevaccineerd wordt. Dit zijn influenza stammen waartegen de gebruikte vaccins slechts beperkte of helemaal geen bescherming bieden. Epidemieën die veroorzaakt worden door dit soort stammen hebben een grote potentie om uit te groeien tot een pandemie, welke grote aantallen slachtoffers en grote economische schade kan veroorzaken. Binnen dit project is het de bedoeling om de bestaande vaccinatie aanpak te verbeteren en om geheel nieuwe vaccinatie strategieën te ontwikkelen. Het is de bedoeling dat deze nieuwe vaccins op tal van punten verbetering brengen t.o.v. de bestaande praktijk.

De werkzaamheid van deze vaccins wordt getest in influenza-muismodellen. Muismodellen en hun voorspellende waarde worden binnen de wetenschappelijke wereld breed gedragen in tal van velden, al heeft het ook zijn beperkingen. Deze influenza-muismodellen specifiek hebben bewezen voorspellende waarde voor de reacties die deze vaccins opwekken in de mens en men kan in deze modellen de fundamentele werkingsmechanismen ontrafelen. Experimentele data verkregen in de influenza-muismodellen heeft geleid tot humane trials, en binnen deze trials worden soortgelijke resultaten geboekt als in de muis. Na de experimentele fase in muizen worden de vaccinkandidaten ook bij andere onderzoeksinstituten getest in andere diermodellen en uiteindelijk ook in mensen.

#### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het hoofddoel van het project is het voorkomen van ziekte ten gevolge van influenza infecties bij mensen door de ontwikkeling van verbeterde en nieuwe

influenzavaccins. Daarbij wordt de werkzaamheid van vaccinkandidaten onderzocht door gebruik te maken van influenza muismodellen. We willen ook inzicht krijgen in de werkingsmechanismen van de toegepaste vaccins en de interactie tussen het uenza virus en het afweersysteem van gastheer. Deze kennis kan weer benut worden bij de verbetering en ontwikkeling van vaccins.

Haalbaarheid: De voorgaande jaren zijn al een aantal veelbelovende resultaten geboekt, welke tot verbeterde vaccins zullen leiden in de komende jaren, die onderweg zijn naar onderzoek in mensen en wetenschappelijke publicaties. Het is hiermee aannemelijk dat resultaten uit dit project hun weg naar de kliniek zullen vinden.

#### Referenties:

- Roos A, Roozendaal R, Theeuwsen J, Riahi S, Vaneman J, Tolboom J, Dekking L, Koudstaal W, Goudsmit J, Radošević K. Protection against H5N1 by multiple immunizations with seasonal influenza vaccine in mice is correlated with H5 cross-reactive antibodies. 2015. Vaccine. 33:1739-47.
- Roozendaal R, Tolboom J, Roos A, Riahi S, Theeuwsen J, Bujny MV, Klaren V, Korse HJ, Dekking L, Grootenhuis A, Weverling GJ, Koudstaal W, Goudsmit J, Radošević K. Transient humoral protection against H5N1 challenge after seasonal influenza vaccination of humans. 2014. PLoS One. 30;9(7):e103550.

### 3.3 Belang

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

Het uiteindelijke doel van het project is het voorkomen van ziekte veroorzaakt door influenza infecties bij mensen door de ontwikkeling van verbeterde en nieuwe influenzavaccins. Stap voor stap worden in dit programma vaccins verbeterd. De heilige graal is een universeel influenzavaccin. De wetenschappelijk relevantie is dat, gedurende dit proces van vaccinverbetering, de fundamentele kennis over de werking van vaccins, het immuunsysteem en influenza virussen vergroot wordt. Deze kennis zal ook in de preventie en bestrijding van andere infectieziekten, zoals b.v. hRSV, gebruikt worden. De maatschappelijke relevantie is te vinden in de verbeterde volksgezondheid en de vermindering van de daaraan gekoppelde economische schade, wanneer de kennis die opgedaan wordt binnen dit project, wordt toegepast in de vorm van verbeterde en vernieuwde vaccinproducten.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Vanuit de onderzoekslijnen van het instituut en private partners komen veelbelovende manieren om influenza te bestrijden voort. Hiervan moet dan nog bewezen worden dat deze in levende organismen werken, zelfs als de resultaten behaald in het laboratorium dit lijken te beloven.

De overkoepelende aanpak is om vanuit de laatste inzichten in de wetenschappelijke wereld verbeterde en nieuwe vaccins te produceren. Leidraad hierbij zijn de resultaten, die in het verleden zijn behaald met virus-neutraliserende antilichamen, zoals [REDACTED]. Deze antilichamen zijn zowel profylactisch als therapeutisch zeer effectief tegen influenza infecties. Na toediening van deze antilichamen aan immunologisch naïve dieren en mensen bleek de bescherming volledig en erg breed: met een en hetzelfde antilichaam konden influenzavirussen van verschillende subtypes worden geneutraliseerd. Deze antilichamen zijn verder ontwikkeld en worden momenteel getest in griepatienten. Deze resultaten illustreren iets dat eerst voor onmogelijk werd gehouden, namelijk dat het immuunsysteem in principe de mogelijkheid heeft zodanig te reageren dat de gastheer is beschermd tegen verschillende influenza varianten. De ontwerpstrategie van de verbeterde en nieuwe vaccins benadert het probleem vanaf de andere kant. Daarbij poogt men de immuunrespons zodanig te sturen dat een immunologische bescherming wordt opgewekt die net zo breed (of liever nog breder) en effectief is als die van de bovengenoemde antilichamen. Kortweg: in plaats van mensen de antilichamen toe te dienen, probeer je door vaccinatie te bewerkstelligen dat



mensen zelf zulke beschermende antilichamen aanmaken.

Dit onderzoek loopt al enige tijd binnen het instituut. In de voorgaande experimenten konden samen met onze private partner veelbelovende vaccinkandidaten worden ontwikkeld en getest. In dit project worden de geselecteerde vaccins doorontwikkeld/verbeterd. Het uiteindelijke en ultieme doel is de ontwikkeling van een griepvaccin, dat mensen langdurig beschermt tegen alle mogelijke influenza varianten.

#### Referenties:

- Dreyfus C, Laursen NS, Kwaks T, Zuidgeest D, Khayat R, Ekiert DC, Lee JH, Metlagel Z, Bujny MV, Jongeneelen M, van der Vlugt R, Lamrani M, Korse HJ, Geelen E, Sahin Ö, Sieuwerts M, Brakenhoff JP, Vogels R, Li OT, Poon LL, Peiris M, Koudstaal W, Ward AB, Wilson IA, Goudsmit J, Friesen RH. Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses. 2012. Science. 337:1343-8.
- Ekiert DC, Friesen RH, Bhabha G, Kwaks T, Jongeneelen M, Yu W, Ophorst C, Cox F, Korse HJ, Brandenburg B, Vogels R, Brakenhoff JP, Kompier R, Koldijk MH, Cornelissen LA, Poon LL, Peiris M, Koudstaal W, Wilson IA, Goudsmit J. 2011. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. Science 333:843-850.
- Koudstaal W, Koldijk MH, Brakenhoff JP, Cornelissen LA, Weverling GJ, Friesen RH, Goudsmit J. 2009. Pre- and postexposure use of human monoclonal antibody against H5N1 and H1N1 influenza virus in mice: viable alternative to oseltamivir. J. Infect. Dis. 200:1870-1873.
- Throsby M, van den Brink E, Jongeneelen M, Poon LL, Alard P, Cornelissen L, Bakker A, Cox F, van Deventer E, Guan Y, Cinatl J, ter Meulen J, Lasters I, Carsetti R, Peiris M, de Kruif J, Goudsmit J. 2008. Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM+ memory B cells. PLoS One 3:e3942.

---

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

---

#### Deelproject A: Opzetten, uitwerken en testen van nieuwe vaccinatie technieken

Binnen dit deelproject zullen de volgende typen experimenten worden uitgevoerd:

##### 1) Vaccinatie/challenge experimenten:

Het merendeel van de experimenten binnen dit project zijn vaccinatie-challenge experimenten. In dit type experiment is het primair de bedoeling om na te gaan of een bepaalde vaccinsamenstelling effectief beschermt tegen influenzavirus infecties. Daarvoor worden muizen een of meerdere keren gevaccineerd, waarna ze worden geïnfecteerd met influenzavirus (de challenge). Om de meest optimale vaccinkandidaten te kunnen selecteren voor verdere ontwikkeling zullen verschillende aspecten met elkaar worden vergeleken: *i*) samenstelling van vaccins, b.v. hoeveelheid antigeen, aard en hoeveelheid van een immuunstimulerend additief, *ii*) aantal vaccinaties, en *iii*) toedieningsroute. De groepsgrootte wordt m.b.v. van statistische analyse bepaald. Hierbij wordt rekening gehouden met de voorgaande variaties, de karakteristieken van het gebruikte influenza muismodel en de resultaten van eerder uitgevoerde studies.

#### Deelproject B: Opzetten en controle van influenza modellen in muizen

Voor onderzoek naar de werkzaamheid van influenzavaccins worden influenza muismodellen gebruikt. Binnen het Instituut is een uitgebreide set modellen beschikbaar. Toch kan het nodig zijn om een nieuw model op te zetten om na te kunnen gaan of een vaccin kandidaat ook tegen deze variant kan beschermen. Dit geldt bv. voor een H2 type influenzavirus, dat nog in de set ontbreekt, maar wel belangrijk is omdat het pandemische potentie heeft (het is

zo lang geleden dat zo'n virus rondwaarde dat een groot deel van de wereldbevolking geen H2 immuniteit meer heeft). Incidenteel is het nodig om bestaande influenzamodellen opnieuw te valideren/ karakteriseren, bijvoorbeeld bij de overgang van de oude naar een nieuw-geproduceerde virusstock.

Voor het opzetten en controleren van muismodellen zijn de volgende dierexperimenten nodig:

2) Adaptatie in muis:

Omdat de meeste influenzavirussen niet direct virulent zijn in muizen, moeten ze eerst aan de nieuwe gastheer worden aangepast d.m.v. long passages.

3) Bepalen van de optimale infectiedosis:

In dit experiment worden muizen geïnfecteerd met verschillende aflopende verdunningen van het virus om zodoende de optimale infectiedosis van het muis-geadapteerde virus te kunnen bepalen.

4) Bepaling van dynamische bereik:

Om de integriteit en vergelijkbaarheid van de influenzamodellen te bewaken lopen in alle vaccin-experimenten de volgende controlegroepen mee:

i) antilichaamcontrole, die 100% bescherming geeft (██████ voor groep 1 virussen [b.v. ██████ en ██████ en ██████ voor groep 2 virussen [b.v. ██████]]) en ii) een PBS controle, die 0% bescherming geeft. Deze controles geven aan of het model binnen de verwachte bandbreedte werkt en maken het mogelijk om reeksen van experimenten en verschillende influenzamodellen met elkaar te vergelijken. In dit type experiment worden de controles voor de nieuwe muis-geadapteerde influenzastock eerst apart getest.

### Deelproject C: Fundamentele kennis over de werkingsmechanismen van de vaccins

Doel van dit deelproject is om inzicht te krijgen in de werkingsmechanismen van de vaccins, m.a.w. welke onderdelen van het immuunsysteem worden door vaccinatie gestimuleerd. Deze kennis kan worden toegepast om vaccins verder te verbeteren.

Hiervoor zullen de volgende typen experimenten worden uitgevoerd:

5) Aandeel antilichaam component:

Om vast te stellen wat het aandeel is van de antilichamenrespons (humorale immuunsysteem) in de bescherming door het vaccin, wordt een tweedelig experiment uitgevoerd. In het eerste deel worden muizen geïmmuniseerd met de kandidaat vaccins en vervolgens verbloed om het serum te oogsten. Dit serum wordt in het tweede deel toegediend aan nieuwe, immunologisch naïeve muizen, die daarna met influenzavirus worden geïnfecteerd. De mate waarin de tweede groep muizen wordt beschermd is gerelateerd aan de door vaccinatie opgewekte antilichaamrespons.

6) Aandeel cellulaire component:

Om vast te stellen wat het aandeel is van de cellulaire immuniteit in de bescherming na vaccinatie, wordt het volgende experiment uitgevoerd. Muizen worden gevaccineerd en vervolgens geïnfecteerd met influenzavirus. Net voor de infectie worden de dieren behandeld met antilichamen die specifiek componenten van het cellulaire immuunsysteem (b.v. CD4 of CD8 T cellen) uitschakelen. Het verschil in bescherming tussen de muizen die na vaccinatie wel en niet behandeld zijn met zo'n T cel antilichaam geeft het aandeel weer van het uitgeschakelde onderdeel van het cellulaire immuunsysteem.

7) Invloed bestaande immuniteit:

Dit onderdeel is wetenschappelijk relevant en wordt ook door toezichthoudende instanties (registratie-autoriteit) van belang geacht. Voor de selectie van geschikte vaccins worden deze eerst getest in muizen, die nooit eerder zijn blootgesteld aan influenza. Echter, als deze vaccins worden toegepast bij de mens, moet rekening worden gehouden met het feit dat de meeste mensen al bestaande immuniteit tegen influenzavirussen hebben, omdat ze vanaf jonge leeftijd jaarlijks in contact komen met verschillende influenza varianten. Deze bestaande immuniteit kan mogelijk storen bij vaccinatie: het maakt het vaccin onwerkzaam. Sterker nog, op theoretische gronden is het mogelijk geacht dat de combinatie van bestaande immuniteit en vaccinatie de ziekte veroorzaakt door een influenza infectie kan verergeren. Om deze effecten uit te sluiten, wordt een vaccinatie-challenge experiment uitgevoerd dit keer met muizen die al antistoffen tegen verschillende influenzavirussen hebben. Door bloedafname kan bekeken worden of de opbouw van antilichaamtiters tegen het vaccinvirus normaal verloopt. De reactie op de challenge van muizen met pre-immunisatie wordt afgezet tegen die van muizen die geen bestaande immuniteit hadden.

---

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

De vaccinatie/challenge experimenten zijn van belang om de optimale samenstellingen van vaccins, dosis, toedieningsroutes en aantal benodigde vaccinaties te bepalen. Deze variabelen worden met elkaar vergeleken, waarna de meest effectieve wordt gebruikt in vervolgexperimenten. Hierdoor is het mogelijk om de vaccins en vaccinatiestrategieën op een systematische wijze te verbeteren. Dit werk wordt uitgevoerd in deelproject A (Opzetten, uitwerken en testen van nieuwe vaccinatietechnieken).

Om deze experimenten te kunnen uitvoeren zijn werkbare, reproduceerbare infectiemodellen nodig. In de afgelopen jaren is een breed panel van influenza muismodellen ontwikkeld. Zij hebben sindsdien hun waarde bewezen. We houden er rekening mee dat het nodig is om nieuwe influenza muismodellen op te zetten. Alle experimenten in deelproject B (Opzetten en controle van influenza modellen in muizen) spelen een rol in het verkrijgen en controleren van de influenza muismodellen.

Deelproject C (Fundamentele kennis over de werkingsmechanismen van de vaccins) is bedoeld om inzicht te krijgen in de werkingsmechanismen van de vaccins, die voortkomen uit deelproject A. Deze kennis kan worden gebruikt om vaccinformuleringen te optimaliseren, zodat deze de voor bescherming belangrijke componenten van het immuunsysteem extra stimuleren.

---

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

| Volgnummer | Type dierproef                                |
|------------|-----------------------------------------------|
| 1          | Vaccinatie/challenge experiment               |
| 2          | Virusadaptatie in muis                        |
| 3          | Bepaling van infectiedosis                    |
| 4          | Bepaling van dynamische bereik influenzamodel |
| 5          | Aandeel antilichaam component                 |
| 6          | Aandeel cellulaire component                  |
| 7          | Invloed bestaande immuniteit                  |
| 8          |                                               |
| 9          |                                               |
| 10         |                                               |

Postbus 65 | 8200 AB Lelystad

Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Geachte heer, mevrouw,

Onderstaand het advies van de DEC aangaande het project

#### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD40100201562**
2. Titel van het project: Ontwikkeling van influenza (griep) vaccins
3. Titel van de NTS: Ontwikkeling van Influenza (griep) vaccins
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:

Secretaris:

6. Adviestraject  
Ontvangen door DEC: 16-04-2015  
Aanvraag compleet: 16-04-2015  
In vergadering besproken: 24-04-2015
7. Correspondentie met de aanvrager  
Datum vragen: 29-04-2015  
Strekking van de vragen:
  - De DEC heeft vragen gesteld over:
    - Het gebruik van anesthesie bij bloedafname d.m.v. wangprik. Weegt het ongerief van de anesthesie op tegen de wangprik?
    - Het combineren van experimenten.
  - De DEC heeft tekstuele aanpassingen geadviseerd.Datum antwoorden: 04-05-2015  
Strekking van de antwoorden:
  - Er zijn tekstuele aanpassingen gedaan om tot een grotere duidelijkheid te komen.

Dierexperimenten

DATUM  
7 mei 2015

ONDERWERP  
aanvraag projectvergunning  
AVD40100201562

UW KENMERK  
AVD40100201562

POSTADRES

BEZOEKADRES

INTERNET

KVK NUMMER

CONTACTPERSOON

TELEFOON

E-MAIL

- Op vragen van de DEC:
  - dat de wangprik voor het afnemen van bloed niet gebeurt onder narcose.
  - Dat waar mogelijk experimenten worden gecombineerd en dat de mogelijkheden hiertoe bij de diverse experimenten zijn aangegeven.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

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

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord is.
2. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën in overeenstemming zijn met de hoofddoelstellingen.
3. Het reële belang van het project, te weten het vergaren van fundamentele kennis over de werking van vaccins, het immuunsysteem en influenza en daardoor bijdragen aan de ontwikkeling van een universeel langwerkend influenzavaccin, wordt door de DEC onderschreven.
4. De DEC stelt vast dat de expertise van de onderzoekers, de voorzieningen waar de experimenten uitgevoerd worden en de onderzoeksstrategie kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling van het project.
5. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als matig en ernstig realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit i.m. toediening van vaccin of intranasale toediening van vaccin en/of challengevirus onder anesthesie, griepverschijnselen (bol zitten, algehele malaise, ademhalingsproblemen, minder eetlust).
6. De DEC heeft vastgesteld dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Het immuunsysteem is in vitro niet goed na te bootsen.
7. De DEC heeft vastgesteld dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Kandidaatvaccins worden eerst in het lab getest en alleen de meest veelbelovende kandidaten worden in dierproeven verder getest. Ook worden, indien mogelijk, experimenten gecombineerd om zo controlegroepen te besparen. De aanvrager beschikt over voldoende expertise om te voorkomen dat eerder gedaan onderzoek herhaald wordt.
8. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. Om onnodig lijden te voorkomen worden HEP's gehanteerd. Verder worden belastende handelingen zoals intranasale toediening onder anesthesie uitgevoerd. De DEC is overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
9. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.

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

DATUM  
7 mei 2015

PAGINA  
3 van 3

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

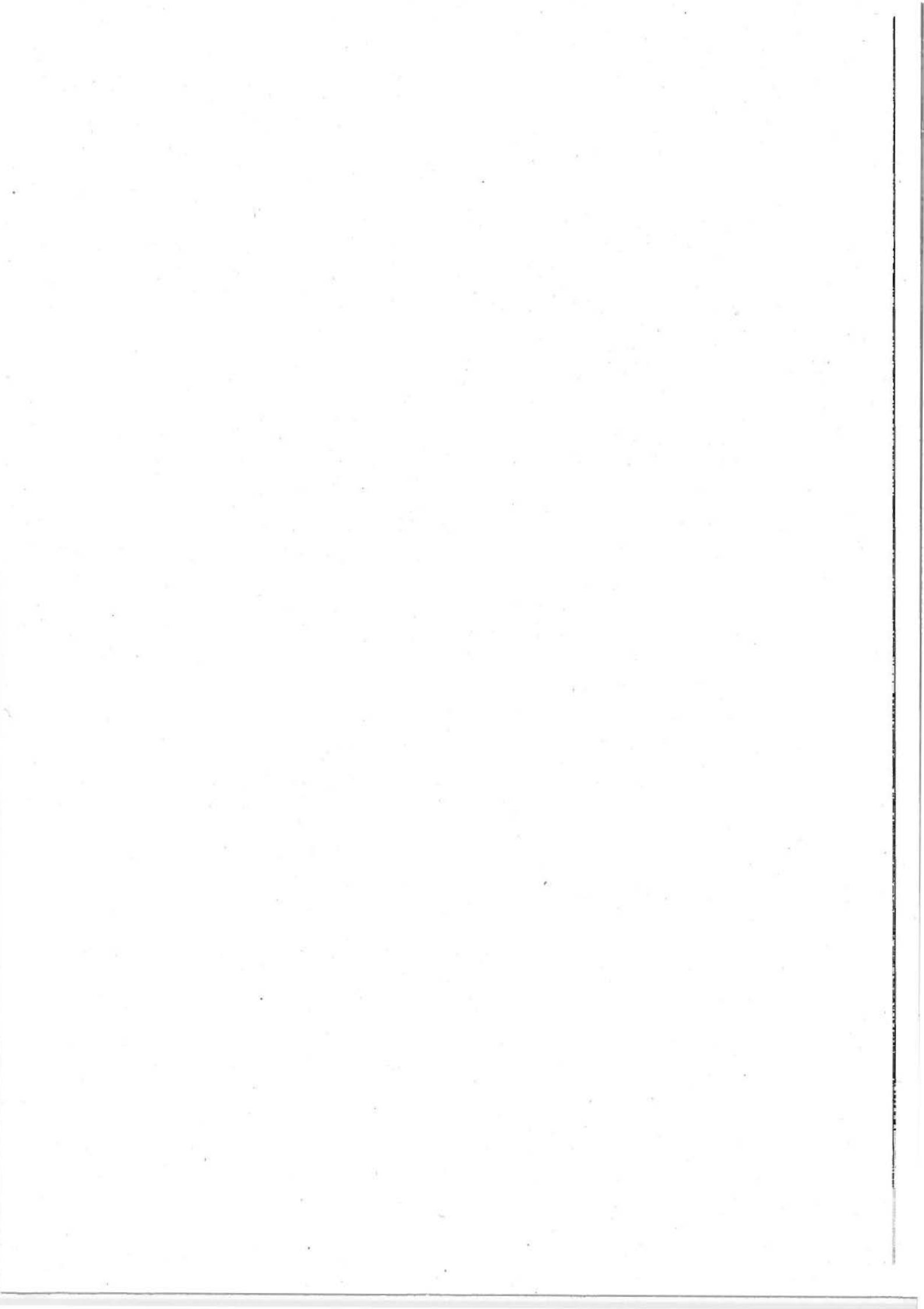
- De DEC is unaniem van mening dat het doel en de haalbaarheid van het project het gebruik van proefdieren en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan rechtvaardigt. Dit project kan een bijdrage leveren aan de ontwikkeling van een universeel influenzavaccin. De DEC merkt op dat als er een universeel langdurig vaccin ontwikkeld is, dit grote gevolgen heeft voor de farmaceutische industrie. Er zal veel minder vaccin nodig zijn. De DEC is van mening dat deze gevolgen niet opwegen tegen de voordelen voor de volksgezondheid en de economische voordelen van een lager ziekteverzuim door griep. De uitvoering is verder niet in strijd met andere ethische overwegingen m.b.t. het gebruik van proefdieren.

#### **E. Advies**

De DEC adviseert unaniem de vergunning te verlenen.

Met vriendelijke groet,









## Format

### Niet-technische samenvatting

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

## 1 Algemene gegevens

|                              |                                            |
|------------------------------|--------------------------------------------|
| 1.1 Titel van het project    | Ontwikkeling van influenza (griep) vaccins |
| 1.2 Looptijd van het project | 01-06-2015 tot 01-06-2020                  |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Influenza, griepvirus                      |

## 2 Categorie van het project

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

### 3 Projectbeschrijving

- |                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)</p> | <p>Griep wordt veroorzaakt door influenzavirussen. Het influenzavirus is erg besmettelijk, dat betekent dat het gemakkelijk van mens op mens kan worden overgedragen. Mensen met griep kunnen behoorlijk ziek zijn. Ze hebben allerlei klachten, zoals koorts, hoofdpijn, keelpijn, spierpijn en hoesten.</p> <p>Mensen met verhoogd risico op complicaties ten gevolge van de griep komen in aanmerking voor de grieprik. De World Health Organization (WHO) houdt bij welke influenzavirusstammen in de wereld rondgaan en maakt elk jaar een voorspelling welke virusstammen de grootste kans hebben om in de komende winter voor problemen te zorgen. De vaccinfabrikanten zorgen er dan voor dat deze virussen in de grieprik zitten. Soms werkt het vaccin niet goed, omdat de samenstelling van het vaccin niet goed aansluit bij de rondwarende griepvirussen. In dat jaar kan een flinke epidemie ontstaan.</p> <p>Vogels en ook varkens hebben hun eigen influenzavirussen, die niet makkelijk overspringen naar de mens. Toch bestaat er een kleine kans dat het wel gebeurt. We hebben dit de afgelopen jaren gezien bij de Mexicaanse griep (varken naar mens) en de vogelgriep (vogel naar mens). Omdat de bevolking geen antistoffen tegen zo'n virus heeft en tegen zo'n vreemd virus ook niet direct een vaccin voorradig is, kan een epidemie uitgroeien tot een zogenaamde pandemie (een grote wereldwijde epidemie), waarbij de impact op de volksgezondheid groot is. In zo'n situatie ontstaat ook grote maatschappelijke onrust en economische schade, omdat mensen met belangrijke functies (leraren, buschauffeurs, artsen, verplegers, politieagenten, etc.) niet meer in staat zijn om op het werk te komen.</p> <p>Doel van het project is om vaccins te ontwikkelen, die bijdragen aan de preventie van griep bij de mens. Het gaat om verbeterde versies van bestaande vaccins en om geheel nieuwe vaccins. Het ideale vaccin zou na eenmalige toediening mensen levenslang moeten beschermen tegen alle influenza varianten (de jaarlijks terugkerende seizoensgriep en nieuwe, nog onbekende influenzavirussen, die pandemieën kunnen veroorzaken): één prik tegen alle influenzavirussen.</p> |
| <p>3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?</p>         | <p>Dit project moet leiden tot de ontwikkeling van vaccins, die brede en langdurige bescherming bieden tegen influenzavirus infecties: een grieprik tegen alle influenzavirussen. Zulke vaccins kunnen een gunstige bijdrage leveren aan de volksgezondheid. Elk jaar krijgen wereldwijd 3-5 miljoen mensen een ernstige vorm van griep. Sommige mensen worden zelfs zo ziek dat ze eraan overlijden (wereldwijd naar schatting 250.000 tot 500.000 sterfgevallen per jaar).</p> <p>Dit project kan verder bijdragen aan verdieping van de kennis van de mechanismen achter de werking van griepvaccins en mogelijk ook van vaccins tegen andere virale aandoeningen.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <p>3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?</p>                                                                          | <p>Om te onderzoeken of en in welke dosis de ontworpen vaccins (het meest) werkzaam zijn, gebruiken we de muis als model voor de mens. Als muizen worden besmet met een influenzavirus krijgen ze een longontsteking en worden ze ziek, vergelijkbaar met mensen met longontsteking volgend op een influenzavirus infectie. Als het vaccin kan voorkomen dat de muizen ziek worden, heeft dit voorspellende waarde voor de werking van het vaccin bij mensen.</p> <p>Er zullen naar schatting 3200 muizen per jaar worden gebruikt.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

|     |                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.4 | Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | Het vaccin wordt toegediend via een injectie in de pootspier of in druppelvorm via de neus. Voor besmetting met influenzavirus worden de muizen eerst onder narcose gebracht en dan wordt een kleine hoeveelheid vloeistof met virus in de neus gedruppeld. De muizen kunnen na de besmetting ernstig ziek worden. Ze hebben minder eetlust, gaan bol zitten als teken van algehele malaise en vertonen ademhalingsproblemen.                                                                                             |
| 3.5 | Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?                   | Naar verwachting zal de verdeling van ongerief over het totale aantal dieren zo zijn: 30% ernstig en 70% matig. De ziekteverschijnselen optredend na de influenzavirus infectie zijn grotendeels bepalend voor het ongerief. Deze zijn ernstiger naarmate een hogere dosis van het virus wordt toegediend. In vaccinatiestudies worden de dieren niet ziek als het vaccin goed beschermt en is het ongerief matig; als het vaccin niet/minder goed werkt, worden de dieren wel ziek en loopt het ongerief op tot ernstig. |
| 3.6 | Wat is de bestemming van de dieren na afloop?                                                 | De dieren worden na afloop geëuthanaseerd. Ze kunnen niet meer in andere proeven worden gebruikt, omdat ze zijn besmet met griepvirussen die ook besmettelijk zijn voor de mens.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

## 4 Drie V's

|     |                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 4.1 | <b>Vervanging</b><br>Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden. | Met de huidige stand van de wetenschap is het niet mogelijk om de beschermende werking van vaccins zonder gebruik van proefdieren te bepalen. We zijn nog niet in staat om de reactie van het afweersysteem (immuunsysteem) van een levend wezen op een vaccin of een virus in het laboratorium volledig na te bootsen. Er wordt wel geprobeerd, ook in dit project, om de werking van nieuwe kandidaat vaccins eerst in het laboratorium te voorspellen, bijvoorbeeld door te kijken of de antistoffen, die de muis aanmaakt na vaccinatie, in staat zijn om de vermenigvuldiging van verschillende influenzavirussen in celkweek te voorkomen. Er worden ook computerprogramma's gebruikt om met behulp van de bestaande kennis van de structuur van het influenzavirus een goed ontwerp te maken van het eiwit dat in het vaccin moet worden gebruikt. |
| 4.2 | <b>Vermindering</b><br>Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.                                                         | Voordat influenzavaccins worden getest in dieren, worden ze eerst uitvoerig getest in het lab, alleen de meest veelbelovende vaccins zullen worden getest in dieren. Het aantal benodigde dieren in de experimenten wordt uitvoerig statistisch doorgerekend, om het aantal dieren te kunnen beperken, maar tegelijkertijd wel de zekerheid te hebben dat de gegevens die uit het experiment komen, bruikbaar zijn om conclusies uit te trekken (en om zo te voorkomen dat experimenten herhaald moeten worden).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 4.3 | <b>Verfijning</b><br>Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het      | Het influenza muismodel is in de wetenschappelijke wereld geaccepteerd als geschikt diermodel voor het testen van vaccins en medicijnen voor toepassing in de mens in de eerste fase van ontwikkeling. Binnen dit project wordt al meer dan tien jaar intensief gewerkt met influenza muismodellen en deze hebben hun waarde bewezen.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

[

project.

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

De dieren worden onder narcose gebracht als virus moet worden toegediend in de neus. Het gedrag en de gezondheid van de dieren wordt dagelijks beoordeeld. Als de muizen griep-achtige symptomen laten zien wordt het toezicht intensiever. Wanneer de ziekte bij de muizen ernstig wordt, zullen de dieren worden geëuthanaseerd om zo onnodig lijden te voorkomen.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

**Van:** [redacted]@wur.nl>  
**Verzonden:** dinsdag 23 juni 2015 9:31  
**Aan:** ZBO-CCD  
**Onderwerp:** FW: Aanvullingen projectaanvraag AVD40100201562 Ontwikkeling van Influenza (griep) vaccins

**Categorieën:** Dossierhouder: [redacted]

Beste mijnheer [redacted]

Daar ik nog niets vernomen heb op de recentelijk gestuurde antwoorden op de vragen in uw mail van 4 juni j.l., ben ik bang dat er iets misgegaan zou kunnen zijn in het versturen van onderstaande mail. Daarom voor de zekerheid nogmaals de bewuste mail (zie hieronder).

Verder zou ik graag willen informeren naar het traject dat de bijhorende aanvraag moet doorlopen. De termijn van 20 dagen (wanneer men de aanvraag vergezeld van DEC toestemming indiende) die de vergunninghouder, IvD en samenwerkende onderzoekers mij als onderzoeker hebben voorgespiegeld is op dit moment ruimschoots overschreden. Deadlines gesteld door onze industriële partners beginnen ondertussen sterk onder druk te staan en de voortgang van dit project begint gevaar te lopen. Op het moment is het onduidelijk wat er verwacht kan worden en graag zouden wij iets te weten komen over de voortgang van de aanvraag?

Bij voorbaat dank!

Met Vriendelijke Groeten,

[redacted]

[redacted]

 P.O. Box 65  
[redacted]  
 Branch office  
[redacted]  
The Netherlands  
 [redacted]  
 [redacted]  
 [redacted]@wur.nl  
 [redacted]

De Animal Sciences Group van Wageningen UR bestaat uit Praktijkonderzoek Veehouderij, het Nederlands Instituut voor Visserijonderzoek, Centraal Veterinair Instituut en Departement Dierwetenschappen van Wageningen Universiteit

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

\* This message is intended exclusively for the addressee. It may contain information that is confidential. Any use or publication of this e-mail message without permission of Animal Sciences Group, Wageningen UR is not allowed. If you are not the intended recipient please notify us and destroy this message.

---

**From:** [redacted]  
**Sent:** maandag 8 juni 2015 16:47  
**To:** 'ZBO-CCD'  
**Subject:** RE: Aanvullingen projectaanvraag AVD40100201562 Ontwikkeling van Influenza (griep) vaccins

Geachte mijnheer [REDACTED]

Via dit kanaal wil ik graag reageren op in de recente mail gestelde vragen:

1.) Dat het vaccin in de toekomst ook bij mannelijke individuen wordt toegepast is in deze fase van het onderzoek nog niet aan de orde. Het onderzoek heeft tot doel om 'proof of principle', bewijs van werkzaamheid (= bescherming) aan te tonen, waarbij de muis wordt 'gebruikt' als 'immuun-competent systeem'. Het is niet waarschijnlijk dat het geslacht van de muizen van invloed is op de uiteindelijke conclusies t.a.v. de potentiële werkzaamheid van het vaccin. Het is wel goed mogelijk dat de mannelijke respons (klinisch en immunologisch) op vaccinatie en infectie afwijkt van de vrouwelijke.

Bij nader inzien had in de projectaanvraag beter kunnen staan: "*zoals in al onze vorige experimenten*". Uit de literatuur blijkt dat de meeste vaccinonderzoeken bij vrouwelijke dieren worden uitgevoerd, maar er zijn inderdaad ook studies die daarvoor mannelijke dieren gebruiken. We hadden in ons onderzoek ook met mannelijke muizen kunnen werken, ook al heeft dat nadelen zoals we eerder hebben opgemerkt (e-mail correspondentie d.d. 20 mei 2015).

Voor evenredig gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren, zouden we met gemengde populaties kunnen werken. Alleen niet in vaccinproeven, omdat de muizen hierin de leeftijd van geslachtsrijpheid bereiken. Wij kunnen in de literatuur geen vaccinstudies vinden, waarin zowel mannelijke als vrouwelijke muizen worden gebruikt.

Een alternatieve mogelijkheid is om groepen met alleen vrouwtjes of alleen mannetjes te gebruiken. Het is methodologisch niet verantwoord om binnen een experiment groepen van verschillend geslacht te gebruiken. Dus zouden we experimenten de ene keer met vrouwtjes en de andere keer met mannetjes moeten uitvoeren. Evenwel, het betekent dat de infectiemodellen ook in mannelijke dieren zullen moeten worden gevalideerd. En omdat de onderzoekers wel willen weten in hoeverre de resultaten onderling vergelijkbaar zijn en ook met die uit onze vorige experimenten, zal ook nog moeten worden onderzocht of de resultaten verkregen met een mannelijke groep gelijk zijn aan die met een vrouwelijke groep muizen. Als verder uit de resultaten blijkt dat de variatie tussen de groepen bij de andere sekse groter is, zal het aantal benodigde proefdieren per groep moeten worden vergroot. Dit alles overwegende vinden wij het niet verantwoord om in deze fase van ons onderzoek (zoals beschreven in de projectaanvraag) de sekse van de proefdieren te veranderen.

Nieuwe geneesmiddelen worden vooral op mannelijke proefdieren getest. Vanwege de grotere vraag naar mannelijke dieren is er een 'biologisch overschot' aan vrouwtjes (verkeerde sekse wordt in ca. 23% als reden genoemd voor overcomplete = "dood in voorraad" (Rapport werkgroep Dood in voorraad (NVWA, Ministerie van EZ, 2013).

De vrouwtjes worden uiteindelijk doodgemaakt, en dan nog gebruikt voor experimenten met dood materiaal, of als diervoer.

Bij proefdierleveranciers is sprake van een surplus aan vrouwelijke muizen. Met het oog daarop worden wetenschappers opgeroepen om, als het kan, vrouwelijke proefdieren te gebruiken. Op basis hiervan vinden de onderzoekers het verantwoord om ook in het vervolgonderzoek enkel vrouwelijke muizen te gebruiken en menen zij daarmee, weliswaar indirect, te kunnen voldoen aan hun "ketenverantwoordelijkheid".

2.) Hieronder een opsomming van het cumulatieve ongerief in de genoemde experimenten:

Experiment 2:

Het is niet duidelijk van te voren te voorspellen, hoe snel het virus zich zal aanpassen aan de nieuwe gastheer en hoe virulent dit virus dan zal zijn en hoe zich dat precies op welk tijdstip zal vertalen in ongerief voor de betrokken dieren. Het is niet ondenkbaar dat de eerste groepen dieren geen tot zeer geringe symptomen van infectie laten zien, omdat het virus nog niet voldoende is aangepast aan de gastheer. In latere adaptatieronden zullen de symptomen over het algemeen ernstiger van aard zijn en daarmee ook het ondervonden ongerief. Echter leert onze ervaring dat het ook wel eens voorkomt dat dieren bij de eerste ronde al symptomen laten zien en ernstig ongerief ondervinden van de infectie. Aangezien dit laatste een mogelijkheid is en de dieren in kwestie geen bescherming genieten, is er van uitgegaan dat het verstandig is het zekere voor het onzekere te nemen en aan te nemen dat

de dieren ernstig ongerief ondervinden. Hetgeen is weergegeven in de aanvraag als: Cumulatieve ongerief: ernstig.

#### Experiment 3:

De dieren dit in dit experiment de hoogste dosis virus toegediend krijgen, zullen zeker ernstig ongerief ondervinden. Als de toegepaste dosisreeks virus goed wordt ingeschat, zal er een omslagpunt in de reeks zitten. Lagere dosis virus, vertaald zich in minder symptomen en een lager ongerief niveau. Echter is van te voren niet met zekerheid te zeggen dat dit ook zo zal plaatsvinden, hieruit komt ook de noodzaak van het experiment voort. Als de dosisreeks ideaal ingeschat wordt over 5 stappen, zal het ongerief globaal ingeschat als volgt verlopen in een experiment met 5 groepen met een virusdosis van hoog naar laag:

Groep 1 (hoogste concentratie virus): 100% ernstig ongerief;

Groep 2: 80-90% ernstig ongerief/10-20% matig ongerief;

Groep 3: 60-70% ernstig ongerief/30-40% matig ongerief;

Groep 4: 30-50% ernstig ongerief/50-70% matig ongerief;

Groep 5 (laagste concentratie virus): 10-30% ernstig ongerief/70-90% matig ongerief.

#### Experiment 4:

Antilichaam behandelde groepen: 50% van de dieren: maximaal cumulatief ongerief: matig.

PBS behandelde groepen: 50% van de dieren, maximaal cumulatief ongerief: ernstig.

#### Experiment 5:

Deel I: 100% van de dieren maximaal cumulatief ongerief: matig.

Deel II: Voor de percentages is aangenomen dat een experiment wordt gedaan met 5 groepen van 10 dieren.

Antilichaamcontrole groep (ca. 20% van dieren in proef): maximaal cumulatief ongerief: matig

Negatieve (onbehandelde) controlegroep (ca. 20% van dieren in proef): maximaal cumulatief ongerief: ernstig

Overige groepen van de dieren die behandeld worden met antiserum (ca. 60% van dieren): maximaal cumulatief ongerief: matig (uit ervaring). Echter als een serum geen bescherming biedt zou het ongerief daardoor kunnen oplopen naar ernstig. Dit is tot nu toe nog nooit voorgekomen in de praktijk, omdat de onderzoekers geïnteresseerd zijn in het werkingsmechanisme van vaccins waarvan experimenteel is vastgesteld van deze effectief zijn. Het is echter niet ondenkbaar, op theoretische gronden, dat een serum helemaal niet beschermd, omdat de bescherming niet gestoeld is op antilichamen.

#### Experiment 7:

Voor percentage is uitgegaan van fictief experiment met 5 groepen van 10 dieren.

Negatieve (ongevaccineerde) controle (20% van dieren in proef): maximaal cumulatief ongerief: ernstig;

Positieve (antilichaam behandelde) controle (20% van dieren in proef): maximaal cumulatief ongerief: matig;

Experimentele gevaccineerde groepen (60% van de dieren in proef): maximaal cumulatief: matig. Als in het ergste geval de bescherming door vaccinatie uitblijft door interferentie voor al bestaande immuniteit, kan dit oplopen tot ernstig ongerief. De kans hierop wordt door de onderzoekers als zeer klein geschat, maar vanwege de uitdrukkelijke vragen van de registratieautoriteiten en FDA dient dit experimenteel worden uitgesloten.

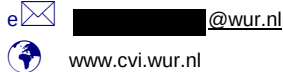
Ik hoop dat dit een antwoord geeft op de gestelde vragen. Mochten er nog vragen of onduidelijkheden zijn, dan hoor ik dat graag.

Met Vriendelijke Groeten,

[Redacted signature]

[Redacted signature]





De Animal Sciences Group van Wageningen UR bestaat uit Praktijkonderzoek Veehouderij, het Nederlands Instituut voor Visserijonderzoek, Centraal Veterinair Instituut en Departement Dierwetenschappen van Wageningen Universiteit

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

\* This message is intended exclusively for the addressee. It may contain information that is confidential. Any use or publication of this e-mail message without permission of Animal Sciences Group, Wageningen UR is not allowed. If you are not the intended recipient please notify us and destroy this message.

---

**From:** ZBO-CCD [<mailto:ZBO-CCD@minez.nl>]

**Sent:** donderdag 4 juni 2015 16:03

**To:** [REDACTED]

**Subject:** RE: Aanvullingen projectaanvraag AVD40100201562 Ontwikkeling van Influenza (griep) vaccins

Geachte [REDACTED]

Zonet heb ik u getelefoneerd op het nr. [REDACTED], maar ik kreeg geen gehoor. Vandaar deze mail.

De Commissie had nog een aantal vragen:

- 1) Uw argumentatie om geen mannelijke muizen te gebruiken heeft de Commissie niet overtuigd. Zij vraagt u om dit wetenschappelijk te onderbouwen, bij voorbeeld aan de hand van enkele literatuurreferenties. Daarnaast wijst de Commissie u ook op de ketenverantwoordelijkheid: u zou moeten kunnen aantonen dat de 16.000 mannelijke muizen (die geboren zijn naast de 16.000 vrouwelijke muizen die u wenst te gebruiken) niet in voorraad gedood worden.
- 2) Bij dierproeven 2, 3, 4, 5 & 7 heeft u niet eenduidig weergegeven welk aantal (of welk percentage) dieren welk cumulatief ongerief zullen ondergaan. Kunt u ons deze gegevens aanleveren?

Gelieve de ontbrekende informatie binnen veertien dagen op te sturen. Zonder deze informatie en de leges is de aanvraag niet compleet. De behandeling van uw aanvraag wordt vanaf vandaag opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is. Zodra de aanvullingen en de leges zijn ontvangen, wordt uw aanvraag verder in behandeling genomen.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Hartelijk dank bij voorbaat.

Vriendelijke groet

[REDACTED]  
Senior Adviseur

Centrale Commissie Dierproeven | [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)

---

Bezuidenhoutseweg 73 | 2500 AV | Den Haag  
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

---

E: [ZBO-CCD@minez.nl](mailto:ZBO-CCD@minez.nl)

T: 0900 28 000 28



---

**Van:** [REDACTED]

**Verzonden:** woensdag 20 mei 2015 15:04

**Aan:** ZBO-CCD

**Onderwerp:** RE: Aanvullingen projectaanvraag AVD40100201562 Ontwikkeling van Influenza (griep) vaccins

Geachte Adviseur [REDACTED]

Vervelend dat het niet lukte om mij telefonisch te pakken te krijgen. Dank voor uw mail. Hierbij mijn antwoorden op de vragen.

- Er zijn aantal redenen te nomen waarom mannelijke muizen minder wenselijk zijn dan vrouwelijke, hier volgen er een aantal. Bij mannelijke muizen komen ontstekingen aan de voorhuid veelvuldig voor, welke de immuun status van de dieren veranderd en de interpretatie van testresultaten bemoeilijkt. De verdeling van muizen over de kooien is willekeurig, om geen statistische bias in te bouwen. Mannetjes zijn meer geneigd elkaar dood te vechten (zeker als deze geen nestgenoten zijn), wat leidt tot onvoorziene sterfte en stress, hetgeen logischerwijs invloed heeft op de uitkomsten van het onderzoek. Ook het bij elkaar huisvesten van zowel mannetjes als vrouwtjes zal voor additionele onrust en stress leiden en bij iets langduriger experimenten (4 maanden is niet uitzonderlijk) ook nog tot ongewenste zwangerschappen leidt, die dit zal de immuun status van de bewuste dieren negatief zal beïnvloeden en de interpretatie van de resultaten bemoeilijken. Al deze factoren gecombineerd geven zoveel ruis/verstoring van de resultaten dat als hier voor gecompenseerd dient te worden de groepsgroottes zoveel groter moeten zijn, dat het gebruik van alleen vrouwelijke dieren als legitiem gezien wordt.
- Het is ons duidelijk dat de gekozen uitleesparameters scherp zijn gesteld. Hierover is al veelvuldig gediscussieerd tussen de onderzoekers binnen het project, met andere collega-onderzoekers, met de DEC, etc.. Bij meta-analyse van de experimentele data van eerdere experimenten blijkt keer op keer dat waardevolle informatie verloren gaat als eerder dan score geëuthanaseerd wordt. In bijgesloten PDF zijn meta-analyses van 2 afzonderlijke experimenten te zien die dit illustreren. In dit geval was de aanname dat euthanasie zou moeten plaatsvinden als dieren 2x een klinische score hebben. Wat blijkt is dat waardevolle informatie verloren gaat uit de experimentele data. Dit zou betekenen dat er meer dieren per experiment zouden moeten zitten en dat er meer experimenten gedaan zouden moeten worden om op hetzelfde kennisniveau te bereiken. Gezien het feit dat reductie van aantal gebruikte proefdieren een van doelstellingen is en wettelijk verplicht werd dit niet gezien als een levensvatbare optie. Bij de door u voorgestelde euthanasie bij klinische score zou dit effect nog groter zijn. Het is in de praktijk zo dat dieren die een score laten zien na influenza infectie, na geslaagde vaccinatie, herstellen en zo bijdragen aan waardevolle experimentele data. Het bovenstaande geldt eigenlijk voor alle experimenten en alle diergroepen in de aanvraag. Spontane sterfte is, jammer genoeg, niet uit te sluiten bij deze experimenten. Maar als de klinische scores 3 bereiken, wordt het toezicht op de dieren geïntensifieerd. Als een score wordt vastgesteld, zal direct worden overgagaan tot euthanasie. Om zodoende het kans op spontane sterfte te verkleinen.

Ik hoop u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd. Mochten er nog onduidelijkheden of vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met Vriendelijke Groeten,

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

- Er zijn aantal redenen te nemen waarom mannelijke muizen minder wenselijk zijn dan vrouwelijke, hier volgen er een aantal. Bij mannelijke muizen komen ontstekingen aan de voorhuid veelvuldig voor, welke de immuun status van de dieren veranderd en de interpretatie van testresultaten bemoeilijkt. De verdeling van muizen over de kooien is willekeurig, om geen statistische bias in te bouwen. Mannetjes zijn meer geneigd elkaar dood te vechten (zeker als deze geen nestgenoten zijn), wat leidt tot onvoorziene sterfte en stress, hetgeen logischerwijs invloed heeft op de uitkomsten van het onderzoek. Ook het bij elkaar huisvesten van zowel mannetjes als vrouwtjes zal voor additionele onrust en stress leiden en bij iets langduriger experimenten (4 maanden is niet uitzonderlijk) ook nog tot ongewenste zwangerschappen leidt, die dit zal de immuun status van de bewuste dieren negatief zal beïnvloeden en de interpretatie van de resultaten bemoeilijken. Al deze factoren gecombineerd geven zoveel ruis/verstoring van de resultaten dat als hier voor gecompenseerd dient te worden de groepsgroottes zoveel groter moeten zijn, dat het gebruik van alleen vrouwelijke dieren als legitiem gezien wordt.
- Het is ons duidelijk dat de gekozen uitleesparameters scherp zijn gesteld. Hierover is al veelvuldig gediscussieerd tussen de onderzoekers binnen het project, met andere collega-onderzoekers, met de DEC, etc.. Bij meta-analyse van de experimentele data van eerdere experimenten blijkt keer op keer dat waardevolle informatie verloren gaat als eerder dan score geëuthanaseerd wordt. In bijgesloten PDF zijn meta-analyses van 2 afzonderlijke experimenten te zien die dit illustreren. In dit geval was de aanname dat euthanasie zou moeten plaatsvinden als dieren 2x een klinische score 3 hebben. Wat blijkt is dat waardevolle informatie verloren gaat uit de experimentele data. Dit zou betekenen dat er meer dieren per experiment zouden moeten zitten en dat er meer experimenten gedaan zouden moeten worden om op hetzelfde kennisniveau te bereiken. Gezien het feit dat reductie van aantal gebruikte proefdieren een van doelstellingen is en wettelijk verplicht werd dit niet gezien als een levensvatbare optie. Bij de door u voorgestelde euthanasie bij klinische score 3 zou dit effect nog groter zijn. Het is in de praktijk zo dat dieren die een score 3 laten zien na influenza infectie, na geslaagde vaccinatie, herstellen en zo bijdragen aan waardevolle experimentele data. Het bovenstaande geldt eigenlijk voor alle experimenten en alle diergroepen in de aanvraag. Spontane sterfte is, jammer genoeg, niet uit te sluiten bij deze experimenten. Maar als de klinische scores 3 bereiken, wordt het toezicht op de dieren geïntensifieerd. Als een score 3 wordt vastgesteld, zal direct worden overgegaan tot euthanasie. Om zodoende het kans op spontane sterfte te verkleinen.

Ik hoop u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd. Mochten er nog onduidelijkheden of vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met Vriendelijke Groeten,

[Redacted signature]

[Redacted address]

[Redacted contact information]

[Redacted footer information]

**From:** ZBO-CCD [<mailto:ZBO-CCD@minez.nl>]

**Sent:** woensdag 20 mei 2015 11:03

**To:** [REDACTED]

**Subject:** Aanvullingen projectaanvraag AVD40100201562 Ontwikkeling van Influenza (griep) vaccins

Geachte [REDACTED]

Ik had nog enkele vragen bij uw projectaanvraag **AVD40100201562 Ontwikkeling van Influenza (griep) vaccins**. Ik heb geprobeerd u telefonisch te contacteren op het nr. [REDACTED], maar ik kreeg geen gehoor. Daarom zend ik u deze mail.

- Waarom worden enkel vrouwelijke muizen gebruikt? De influenzavaccins zullen uiteindelijk toch ook aan mannen en jongens toegediend worden? Daarnaast dreigen de gefokte mannelijke muizen als ongebruikt surplusdier afgevoerd te worden. U schrijft wel "zoals in alle vorige experimenten", maar een supersnelle scan door publicaties van andere onderzoeksgroepen leert me dat zij zowel met mannelijke als met vrouwelijke dieren werken.
- Volgens de Wod, Artikel 13b moet
  - o 1. De dood als eindpunt van een dierproef wordt zoveel mogelijk vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten.
  - o 2. Wanneer de dood als eindpunt van een dierproef onvermijdelijk is, wordt de dierproef zo opgezet dat:
    - a. zo weinig mogelijk dieren sterven; en
    - b. de duur en intensiteit van het lijden van het dier zo gering mogelijk worden gehouden en de dood voor zover mogelijk, pijnloos is.

Bij dierproeven 1, 3, 4, 5, 6 & 7 staat overleving als primaire uitleesparameter. Zijn er geen andere (klinische of niet-klinische) parameters denkbaar die (voor)tijdig de HEP aankondigen en dus spontane sterfte kunnen vermijden? Te denken valt aan lichaamstemperatuur of lichaamsgewicht. Zie ook: <http://www.humane-endpoints.info> Bijkomende vraag is of het nodig is voor het onderzoek om de dieren score te laten bereiken. Zou het doel van de proef niet behaald kunnen worden wanneer de dieren al geëuthanaseerd worden bij score ? Dan hoeven de dieren wellicht ook geen ernstig ongerief te ondergaan. In dierproef 6 (onder C. Hergebruik) schrijft u dat dieren in een vroeger stadium euthanaseren de resolutie van de experimenten enorm zal doen laten afnemen. Geldt dit voor alle hier aangevraagde dierproeven? En ook voor de dieren uit de negatieve controlegroep?

Gelieve de ontbrekende informatie binnen veertien dagen op te sturen, bij voorkeur zo snel mogelijk. Zonder deze informatie en de leges is de aanvraag niet compleet. De behandeling van uw aanvraag wordt vanaf vandaag opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is. Zodra de aanvullingen en de leges zijn ontvangen, wordt uw aanvraag verder in behandeling genomen.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Hartelijk dank bij voorbaat.

Vriendelijke groet

[REDACTED]  
Centrale Commissie Dierproeven | [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)

[REDACTED] | Den Haag  
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

---

E: [ZBO-CCD@minez.nl](mailto:ZBO-CCD@minez.nl)

T: 0900 28 000 28

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** woensdag 20 mei 2015 15:04  
**Aan:** ZBO-CCD  
**Onderwerp:** RE: Aanvullingen projectaanvraag AVD40100201562 Ontwikkeling van Influenza (griep) vaccins  
**Bijlagen:** Response to question DEC [REDACTED] as humane endpoint.pdf

Geachte Adviseur [REDACTED]

Vervelend dat het niet lukte om mij telefonisch te pakken te krijgen. Dank voor uw mail. Hierbij mijn antwoorden op de vragen.

- Er zijn aantal redenen te nomen waarom mannelijke muizen minder wenselijk zijn dan vrouwelijke, hier volgen er een aantal. Bij mannelijke muizen komen ontstekingen aan de voorhuid veelvuldig voor, welke de immuun status van de dieren veranderd en de interpretatie van testresultaten bemoeilijkt. De verdeling van muizen over de kooien is willekeurig, om geen statistische bias in te bouwen. Mannetjes zijn meer geneigd elkaar dood te vechten (zeker als deze geen nestgenoten zijn), wat leidt tot onvoorziene sterfte en stress, hetgeen logischerwijs invloed heeft op de uitkomsten van het onderzoek. Ook het bij elkaar huisvesten van zowel mannetjes als vrouwtjes zal voor additionele onrust en stress leiden en bij iets langduriger experimenten (4 maanden is niet uitzonderlijk) ook nog tot ongewenste zwangerschappen leidt, die dit zal de immuun status van de bewuste dieren negatief zal beïnvloeden en de interpretatie van de resultaten bemoeilijken. Al deze factoren gecombineerd geven zoveel ruis/verstoring van de resultaten dat als hier voor gecompenseerd dient te worden de groepsgroottes zoveel groter moeten zijn, dat het gebruik van alleen vrouwelijke dieren als legitiem gezien wordt.
- Het is ons duidelijk dat de gekozen uitleesparameters scherp zijn gesteld. Hierover is al veelvuldig gediscussieerd tussen de onderzoekers binnen het project, met andere collega-onderzoekers, met de DEC, etc.. Bij meta-analyse van de experimentele data van eerdere experimenten blijkt keer op keer dat waardevolle informatie verloren gaat als eerder dan score geëuthanaseerd wordt. In bijgesloten PDF zijn meta-analyses van 2 afzonderlijke experimenten te zien die dit illustreren. In dit geval was de aanname dat euthanasie zou moeten plaatsvinden als dieren 2x een klinische score 3 hebben. Wat blijkt is dat waardevolle informatie verloren gaat uit de experimentele data. Dit zou betekenen dat er meer dieren per experiment zouden moeten zitten en dat er meer experimenten gedaan zouden moeten worden om op hetzelfde kennisniveau te bereiken. Gezien het feit dat reductie van aantal gebruikte proefdieren een van doelstellingen is en wettelijk verplicht werd dit niet gezien als een levensvatbare optie. Bij de door u voorgestelde euthanasie bij klinische score zou dit effect nog groter zijn. Het is in de praktijk zo dat dieren die een score laten zien na influenza infectie, na geslaagde vaccinatie, herstellen en zo bijdragen aan waardevolle experimentele data. Het bovenstaande geldt eigenlijk voor alle experimenten en alle diergroepen in de aanvraag. Spontane sterfte is, jammer genoeg, niet uit te sluiten bij deze experimenten. Maar als de klinische scores bereiken, wordt het toezicht op de dieren geïntensifieerd. Als een score wordt vastgesteld, zal direct worden overgagaan tot euthanasie. Om zodoende het kans op spontane sterfte te verkleinen.

Ik hoop u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd. Mochten er nog onduidelijkheden of vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met Vriendelijke Groeten,

[REDACTED]

[REDACTED]



@wur.nl

**From:** ZBO-CCD [mailto:ZBO-CCD@minez.nl]

**Sent:** woensdag 20 mei 2015 11:03

**To:** [REDACTED]

**Subject:** Aanvullingen projectaanvraag AVD40100201562 Ontwikkeling van Influenza (griep) vaccins

Geachte [REDACTED]

Ik had nog enkele vragen bij uw projectaanvraag **AVD40100201562 Ontwikkeling van Influenza (griep) vaccins**. Ik heb geprobeerd u telefonisch te contacteren op het nr. [REDACTED], maar ik kreeg geen gehoor. Daarom zend ik u deze mail.

- Waarom worden enkel vrouwelijke muizen gebruikt? De influenzavaccins zullen uiteindelijk toch ook aan mannen en jongens toegediend worden? Daarnaast dreigen de gefokte mannelijke muizen als ongebruikt surplusdier afgevoerd te worden. U schrijft wel "zoals in alle vorige experimenten", maar een supersnelle scan door publicaties van andere onderzoeksgroepen leert me dat zij zowel met mannelijke als met vrouwelijke dieren werken.
- Volgens de Wod, Artikel 13b moet
  - o 1. De dood als eindpunt van een dierproef wordt zoveel mogelijk vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten.
  - o 2. Wanneer de dood als eindpunt van een dierproef onvermijdelijk is, wordt de dierproef zo opgezet dat:
    - a. zo weinig mogelijk dieren sterven; en
    - b. de duur en intensiteit van het lijden van het dier zo gering mogelijk worden gehouden en de dood voor zover mogelijk, pijnloos is.

Bij dierproeven 1, 3, 4, 5, 6 & 7 staat overleving als primaire uitleesparameter. Zijn er geen andere (klinische of niet-klinische) parameters denkbaar die (voor)tijdig de HEP aankondigen en dus spontane sterfte kunnen vermijden? Te denken valt aan lichaamstemperatuur of lichaamsgewicht. Zie ook: <http://www.humane-endpoints.info> Bijkomende vraag is of het nodig is voor het onderzoek om de dieren score 4 te laten bereiken. Zou het doel van de proef niet behaald kunnen worden wanneer de dieren al geëuthanaseerd worden bij score 3? Dan hoeven de dieren wellicht ook geen ernstig ongerief te ondergaan. In dierproef 6 (onder C. Hergebruik) schrijft u dat dieren in een vroeger stadium euthanaseren de resolutie van de experimenten enorm zal doen laten afnemen. Geldt dit voor alle hier aangevraagde dierproeven? En ook voor de dieren uit de negatieve controlegroep?

Gelieve de ontbrekende informatie binnen veertien dagen op te sturen, bij voorkeur zo snel mogelijk. Zonder deze informatie en de leges is de aanvraag niet compleet. De behandeling van uw aanvraag wordt vanaf vandaag opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is. Zodra de aanvullingen en de leges zijn ontvangen, wordt uw aanvraag verder in behandeling genomen.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Hartelijk dank bij voorbaat.

Vriendelijke groet

  
Centrale Commissie Dierproeven | [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)

-----  
 Den Haag  
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

-----  
E: [ZBO-CCD@minez.nl](mailto:ZBO-CCD@minez.nl)

T: 0900 28 000 28

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** maandag 8 juni 2015 16:47  
**Aan:** ZBO-CCD  
**Onderwerp:** RE: Aanvullingen projectaanvraag AVD40100201562 Ontwikkeling van Influenza (griep) vaccins

Geachte mijnheer [REDACTED]

Via dit kanaal wil ik graag reageren op in de recente mail gestelde vragen:

1.) Dat het vaccin in de toekomst ook bij mannelijke individuen wordt toegepast is in deze fase van het onderzoek nog niet aan de orde. Het onderzoek heeft tot doel om 'proof of principle', bewijs van werkzaamheid (= bescherming) aan te tonen, waarbij de muis wordt 'gebruikt' als 'immuun-competent systeem'. Het is niet waarschijnlijk dat het geslacht van de muizen van invloed is op de uiteindelijke conclusies t.a.v. de potentiële werkzaamheid van het vaccin. Het is wel goed mogelijk dat de mannelijke respons (klinisch en immunologisch) op vaccinatie en infectie afwijkt van de vrouwelijke.

Bij nader inzien had in de projectaanvraag beter kunnen staan: "*zoals in al onze vorige experimenten*". Uit de literatuur blijkt dat de meeste vaccinonderzoeken bij vrouwelijke dieren worden uitgevoerd, maar er zijn inderdaad ook studies die daarvoor mannelijke dieren gebruiken. We hadden in ons onderzoek ook met mannelijke muizen kunnen werken, ook al heeft dat nadelen zoals we eerder hebben opgemerkt (e-mail correspondentie d.d. 20 mei 2015).

Voor evenredig gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren, zouden we met gemengde populaties kunnen werken. Alleen niet in vaccinproeven, omdat de muizen hierin de leeftijd van geslachtsrijpheid bereiken. Wij kunnen in de literatuur geen vaccinstudies vinden, waarin zowel mannelijke als vrouwelijke muizen worden gebruikt.

Een alternatieve mogelijkheid is om groepen met alleen vrouwtjes of alleen mannetjes te gebruiken. Het is methodologisch niet verantwoord om binnen een experiment groepen van verschillend geslacht te gebruiken. Dus zouden we experimenten de ene keer met vrouwtjes en de andere keer met mannetjes moeten uitvoeren. Evenwel, het betekent dat de infectiemodellen ook in mannelijke dieren zullen moeten worden gevalideerd. En omdat de onderzoekers wel willen weten in hoeverre de resultaten onderling vergelijkbaar zijn en ook met die uit onze vorige experimenten, zal ook nog moeten worden onderzocht of de resultaten verkregen met een mannelijke groep gelijk zijn aan die met een vrouwelijke groep muizen. Als verder uit de resultaten blijkt dat de variatie tussen de groepen bij de andere sekse groter is, zal het aantal benodigde proefdieren per groep moeten worden vergroot. Dit alles overwegende vinden wij het niet verantwoord om in deze fase van ons onderzoek (zoals beschreven in de projectaanvraag) de sekse van de proefdieren te veranderen.

Nieuwe geneesmiddelen worden vooral op mannelijke proefdieren getest. Vanwege de grotere vraag naar mannelijke dieren is er een 'biologisch overschot' aan vrouwtjes (verkeerde sekse wordt in ca. 23% als reden genoemd voor overcomplete = "dood in voorraad" (Rapport werkgroep Dood in voorraad (NVWA, Ministerie van EZ, 2013).

De vrouwtjes worden uiteindelijk doodgemaakt, en dan nog gebruikt voor experimenten met dood materiaal, of als diervoer.

Bij proefdierleveranciers is sprake van een surplus aan vrouwelijke muizen. Met het oog daarop worden wetenschappers opgeroepen om, als het kan, vrouwelijke proefdieren te gebruiken. Op basis hiervan vinden de onderzoekers het verantwoord om ook in het vervolgonderzoek enkel vrouwelijke muizen te gebruiken en menen zij daarmee, weliswaar indirect, te kunnen voldoen aan hun "ketenverantwoordelijkheid".

2.) Hieronder een opsomming van het cumulatieve ongerief in de genoemde experimenten:

Experiment 2:



Het is niet duidelijk van te voren te voorspellen, hoe snel het virus zich zal aanpassen aan de nieuwe gastheer en hoe virulent dit virus dan zal zijn en hoe zich dat precies op welk tijdstip zal vertalen in ongerief voor de betrokken dieren. Het is niet ondenkbaar dat de eerste groepen dieren geen tot zeer geringe symptomen van infectie laten zien, omdat het virus nog niet voldoende is aangepast aan de gastheer. In latere adaptatieronden zullen de symptomen over het algemeen ernstiger van aard zijn en daarmee ook het ondervonden ongerief. Echter leert onze ervaring dat het ook wel eens voorkomt dat dieren bij de eerste ronde al symptomen laten zien en ernstig ongerief ondervinden van de infectie. Aangezien dit laatste een mogelijkheid is en de dieren in kwestie geen bescherming genieten, is er van uitgegaan dat het verstandig is het zekere voor het onzekere te nemen en aan te nemen dat de dieren ernstig ongerief ondervinden. Hetgeen is weergegeven in de aanvraag als: Cumulatieve ongerief: ernstig.

#### Experiment 3:

De dieren die in dit experiment de hoogste dosis virus toegediend krijgen, zullen zeker ernstig ongerief ondervinden. Als de toegepaste dosisreeks virus goed wordt ingeschat, zal er een omslagpunt in de reeks zitten. Lagere dosis virus, vertaald zich in minder symptomen en een lager ongerief niveau. Echter is van te voren niet met zekerheid te zeggen dat dit ook zo zal plaatsvinden, hieruit komt ook de noodzaak van het experiment voort. Als de dosisreeks ideaal ingeschat wordt over 5 stappen, zal het ongerief globaal ingeschat als volgt verlopen in een experiment met 5 groepen met een virusdosis van hoog naar laag:

Groep 1 (hoogste concentratie virus): 100% ernstig ongerief;

Groep 2: 80-90% ernstig ongerief/10-20% matig ongerief;

Groep 3: 60-70% ernstig ongerief/30-40% matig ongerief;

Groep 4: 30-50% ernstig ongerief/50-70% matig ongerief;

Groep 5 (laagste concentratie virus): 10-30% ernstig ongerief/70-90% matig ongerief.

#### Experiment 4:

Antilichaam behandelde groepen: 50% van de dieren: maximaal cumulatief ongerief: matig.

PBS behandelde groepen: 50% van de dieren, maximaal cumulatief ongerief: ernstig.

#### Experiment 5:

Deel I: 100% van de dieren maximaal cumulatief ongerief: matig.

Deel II: Voor de percentages is aangenomen dat een experiment wordt gedaan met 5 groepen van 10 dieren.

Antilichaamcontrole groep (ca. 20% van dieren in proef): maximaal cumulatief ongerief: matig

Negatieve (onbehandelde) controlegroep (ca. 20% van dieren in proef): maximaal cumulatief ongerief: ernstig

Overige groepen van de dieren die behandeld worden met antiserum (ca. 60% van dieren): maximaal cumulatief ongerief: matig (uit ervaring). Echter als een serum geen bescherming biedt zou het ongerief daardoor kunnen oplopen naar ernstig. Dit is tot nu toe nog nooit voorgekomen in de praktijk, omdat de onderzoekers geïnteresseerd zijn in het werkingsmechanisme van vaccins waarvan experimenteel is vastgesteld van deze effectief zijn. Het is echter niet ondenkbaar, op theoretische gronden, dat een serum helemaal niet beschermd, omdat de bescherming niet gestoeld is op antilichamen.

#### Experiment 7:

Voor percentage is uitgegaan van fictief experiment met 5 groepen van 10 dieren.

Negatieve (ongevaccineerde) controle (20% van dieren in proef): maximaal cumulatief ongerief: ernstig;

Positieve (antilichaam behandelde) controle (20% van dieren in proef): maximaal cumulatief ongerief: matig;

Experimentele gevaccineerde groepen (60% van de dieren in proef): maximaal cumulatief: matig. Als in het ergste geval de bescherming door vaccinatie uitblijft door interferentie voor al bestaande immuniteit, kan dit oplopen tot ernstig ongerief. De kans hierop wordt door de onderzoekers als zeer klein geschat, maar vanwege de uitdrukkelijke vragen van de registratieautoriteiten en FDA dient dit experimenteel worden uitgesloten.

Ik hoop dat dit een antwoord geeft op de gestelde vragen. Mochten er nog vragen of onduidelijkheden zijn, dan hoor ik dat graag.

Met Vriendelijke Groeten,



**From:** ZBO-CCD [mailto:ZBO-CCD@minez.nl]

**Sent:** donderdag 4 juni 2015 16:03

**To:** [Redacted]

**Subject:** RE: Aanvullingen projectaanvraag AVD40100201562 Ontwikkeling van Influenza (griep) vaccins

Geachte Dr. Claassen

Zonet heb ik u getelefoneerd op het nr. [Redacted] maar ik kreeg geen gehoor. Vandaar deze mail.

De Commissie had nog een aantal vragen:

- 1) Uw argumentatie om geen mannelijke muizen te gebruiken heeft de Commissie niet overtuigd. Zij vraagt u om dit wetenschappelijk te onderbouwen, bij voorbeeld aan de hand van enkele literatuurreferenties. Daarnaast wijst de Commissie u ook op de ketenverantwoordelijkheid: u zou moeten kunnen aantonen dat de 16.000 mannelijke muizen (die geboren zijn naast de 16.000 vrouwelijke muizen die u wenst te gebruiken) niet in voorraad gedood worden.
- 2) Bij dierproeven 2, 3, 4, 5 & 7 heeft u niet eenduidig weergegeven welk aantal (of welk percentage) dieren welk cumulatief ongerief zullen ondergaan. Kunt u ons deze gegevens aanleveren?

Gelieve de ontbrekende informatie binnen veertien dagen op te sturen. Zonder deze informatie en de leges is de aanvraag niet compleet. De behandeling van uw aanvraag wordt vanaf vandaag opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is. Zodra de aanvullingen en de leges zijn ontvangen, wordt uw aanvraag verder in behandeling genomen.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Hartelijk dank bij voorbaat.

Vriendelijke groet

---

**Van:** [REDACTED]

**Verzonden:** woensdag 20 mei 2015 15:04

**Aan:** ZBO-CCD

**Onderwerp:** RE: Aanvullingen projectaanvraag AVD40100201562 Ontwikkeling van Influenza (griep) vaccins

Geachte Adviseur [REDACTED]

Vervelend dat het niet lukte om mij telefonisch te pakken te krijgen. Dank voor uw mail. Hierbij mijn antwoorden op de vragen.

- Er zijn aantal redenen te nomen waarom mannelijke muizen minder wenselijk zijn dan vrouwelijke, hier volgen er een aantal. Bij mannelijke muizen komen ontstekingen aan de voorhuid veelvuldig voor, welke de immuun status van de dieren veranderd en de interpretatie van testresultaten bemoeilijkt. De verdeling van muizen over de kooien is willekeurig, om geen statistische bias in te bouwen. Mannetjes zijn meer geneigd elkaar dood te vechten (zeker als deze geen nestgenoten zijn), wat leidt tot onvoorziene sterfte en stress, hetgeen logischerwijs invloed heeft op de uitkomsten van het onderzoek. Ook het bij elkaar huisvesten van zowel mannetjes als vrouwtjes zal voor additionele onrust en stress leiden en bij iets langduriger experimenten (4 maanden is niet uitzonderlijk) ook nog tot ongewenste zwangerschappen leidt, die dit zal de immuun status van de bewuste dieren negatief zal beïnvloeden en de interpretatie van de resultaten bemoeilijken. Al deze factoren gecombineerd geven zoveel ruis/verstoring van de resultaten dat als hier voor gecompenseerd dient te worden de groepsgroottes zoveel groter moeten zijn, dat het gebruik van alleen vrouwelijke dieren als legitiem gezien wordt.
- Het is ons duidelijk dat de gekozen uitleesparameters scherp zijn gesteld. Hierover is al veelvuldig gediscussieerd tussen de onderzoekers binnen het project, met andere collega-onderzoekers, met de DEC, etc.. Bij meta-analyse van de experimentele data van eerdere experimenten blijkt keer op keer dat waardevolle informatie verloren gaat als eerder dan score geëuthanaseerd wordt. In bijgesloten PDF zijn meta-analyses van 2 afzonderlijke experimenten te zien die dit illustreren. In dit geval was de aanname dat euthanasie zou moeten plaatsvinden als dieren 2x een klinische score hebben. Wat blijkt is dat waardevolle informatie verloren gaat uit de experimentele data. Dit zou betekenen dat er meer dieren per experiment zouden moeten zitten en dat er meer experimenten gedaan zouden moeten worden om op hetzelfde kennisniveau te bereiken. Gezien het feit dat reductie van aantal gebruikte proefdieren een van doelstellingen is en wettelijk verplicht werd dit niet gezien als een levensvatbare optie. Bij de door u voorgestelde euthanasie bij klinische score zou dit effect nog groter zijn. Het is in de praktijk zo dat dieren die een score laten zien na influenza infectie, na geslaagde vaccinatie, herstellen en zo bijdragen aan waardevolle experimentele data. Het bovenstaande geldt eigenlijk voor alle experimenten en alle diergroepen in de aanvraag. Spontane sterfte is, jammer genoeg, niet uit te sluiten bij deze experimenten. Maar als de klinische scores 3 bereiken, wordt het toezicht op de dieren geïntensifieerd. Als een score wordt vastgesteld, zal direct worden overgagaan tot euthanasie. Om zodoende het kans op spontane sterfte te verkleinen.

Ik hoop u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd. Mochten er nog onduidelijkheden of vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met Vriendelijke Groeten,

[REDACTED]



euthanaseren de resolutie van de experimenten enorm zal doen laten afnemen. Geldt dit voor alle hier aangevraagde dierproeven? En ook voor de dieren uit de negatieve controlegroep?

Gelieve de ontbrekende informatie binnen veertien dagen op te sturen, bij voorkeur zo snel mogelijk. Zonder deze informatie en de leges is de aanvraag niet compleet. De behandeling van uw aanvraag wordt vanaf vandaag opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is. Zodra de aanvullingen en de leges zijn ontvangen, wordt uw aanvraag verder in behandeling genomen.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Hartelijk dank bij voorbaat.

Vriendelijke groet

  
Centrale Commissie Dierproeven | [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)

 Den Haag  
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

E: [ZBO-CCD@minez.nl](mailto:ZBO-CCD@minez.nl)

T: 0900 28 000 28

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

**Van:** ZBO-CCD  
**Verzonden:** vrijdag 5 juni 2015 11:41  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** Ter informatie: Gevraagde aanvullingen projectaanvraag AVD40100201562  
Ontwikkeling van Influenza (griep) vaccins

Geachte mevrouw [REDACTED]

Graag wil ik de DEC-DLO ter kennisgeving meedelen dat de Centrale Commissie Dierproeven nog enkele vragen heeft voorgelegd aan [REDACTED], indiener van de projectaanvraag AVD40100201562 met titel "Ontwikkeling van Influenza (griep) vaccins".

De Commissie vraagt de aanvrager de keuze voor enkel vrouwelijke proefdieren wetenschappelijk te motiveren en wijst de aanvrager daarbij ook op de ketenverantwoordelijkheid: voor elke vrouwelijke muis wordt er ook een mannelijke muis geboren. De Commissie is bezorgd dat (bijna) al deze mannelijke dieren in voorraad zullen gedood worden indien de aanvrager enkel vrouwelijke dieren gebruikt en vraagt hem aan te tonen dat dit niet zal gebeuren.

De Commissie vraagt de aanvrager bij dierproeven 2, 3, 4, 5 en 7 eenduidig aan te geven welk aantal (of welk percentage) dieren welk cumulatief ongerief zullen ondergaan.

Met vriendelijke groet

[REDACTED]

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven | [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)

[REDACTED] Den Haag  
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

E: [REDACTED]  
T: 0900 28 000 28

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** maandag 29 juni 2015 16:42  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** Terugkoppeling aanvraag projectvergunning AVD40100201562

Geachte mevrouw [REDACTED]

Op 11 mei 2015 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project "Ontwikkeling van Influenza (griep) vaccins" met aanvraagnummer AVD40100201562.

De CCD heeft besloten de vergunning gedeeltelijk toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

Langs deze weg willen wij u graag informeren over de gestelde vragen aan de onderzoeker:

- 1) Waarom worden enkel vrouwelijke muizen gebruikt? De influenzavaccins zullen uiteindelijk toch ook aan mannen en jongens toegediend worden? Daarnaast dreigen de gefokte mannelijke muizen als ongebruikt surplusdier afgevoerd te worden. U schrijft wel "zoals in alle vorige experimenten", maar een supersnelle scan door publicaties van andere onderzoeksgroepen leert me dat zij zowel met mannelijke als met vrouwelijke dieren werken.
- 2) Volgens de Wod, Artikel 13b moet
  - a. 1. De dood als eindpunt van een dierproef wordt zoveel mogelijk vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten.
  - b. 2. Wanneer de dood als eindpunt van een dierproef onvermijdelijk is, wordt de dierproef zo opgezet dat:
    - i. a. zo weinig mogelijk dieren sterven; en
    - ii. b. de duur en intensiteit van het lijden van het dier zo gering mogelijk worden gehouden en de dood voor zover mogelijk, pijnloos is.

Bij dierproeven 1, 3, 4, 5, 6 & 7 staat overleving als primaire uitleesparameter. Zijn er geen andere (klinische of niet-klinische) parameters denkbaar die (voor)tijdig de HEP aankondigen en dus spontane sterfte kunnen vermijden? Te denken valt aan lichaamstemperatuur of lichaamsgewicht. Zie ook: <http://www.humane-endpoints.info> Bijkomende vraag is of het nodig is voor het onderzoek om de dieren score te laten bereiken. Zou het doel van de proef niet behaald kunnen worden wanneer de dieren al geëuthanaseerd worden bij score Dan hoeven de dieren wellicht ook geen ernstig ongerief te ondergaan. In dierproef 6 (onder C. Hergebruik) schrijft u dat dieren in een vroeger stadium euthanaseren de resolutie van de experimenten enorm zal doen laten afnemen. Geldt dit voor alle hier aangevraagde dierproeven? En ook voor de dieren uit de negatieve controlegroep?

- 3) Bij dierproeven 2, 3, 4, 5 & 7 heeft u niet eenduidig weergegeven welk aantal (of welk percentage) dieren welk cumulatief ongerief zullen ondergaan. Kunt u ons deze gegevens aanleveren?

Vragen 2) en 3) zijn naar voldoening beantwoord, maar voor wat vraag 1) betreft meent de CCD dat de DEC voorbijgegaan is aan het ontbreken van een wetenschappelijke onderbouwing voor het gebruik van enkel vrouwelijke dieren. Het gebruik van dieren van één sekse leidt tot het verhogen van het aantal dieren dat in voorraad gedood wordt.

De Commissie volgt de aanvrager in diens zienswijze, verwoord in diens mail d.d. 08 juni 2015, dat het niet waarschijnlijk is dat het geslacht van de muizen van invloed is op de uiteindelijke conclusies ten aanzien van de potentiële werkzaamheid van de vaccins.

Zij deelt de zienswijze van de aanvrager dat het nodig is om enkele dierproeven vooraf te valideren met mannelijke dieren, alsook bijkomende experimenten uit te voeren om te achterhalen of de

resultaten met mannelijke dieren vergelijkbaar zijn met de (historische) resultaten met vrouwelijke dieren en of de variatie bij mannelijke dieren vergelijkbaar is met deze bij vrouwelijke dieren.

Daarom staat de Commissie toe dat voor de hierboven vermelde pilotonderzoeken dierproeven uitgevoerd worden en stelt nadere voorwaarden:

- dat de groepsgrootte voor de dierproeven en de mogelijke herhaling van reeds elders uitgevoerd onderzoek uit deelproject C worden afgestemd met de IvD.
- dat voor alle dierproeven mannelijke en vrouwelijke dieren in evenredige aantallen worden gebruikt. Zo doende wordt voorkomen dat surplusdieren van het mannelijke geslacht moeten gedood worden in voorraad.
- dat de aanvrager de uitkomsten van de pilotonderzoeken aan de CCD rapporteert alvorens de andere dierproeven te starten. De uitkomst van de pilotonderzoeken kan voor de Commissie aanleiding geven om bovenstaande voorwaarde (om voor alle dierproeven mannelijke en vrouwelijke dieren in evenredige aantallen te gebruiken) bij deze projectvergunning te handhaven, dan wel te wijzigen of in te trekken.

Tot slot willen wij u graag danken voor uw advies.

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

Met vriendelijke groet,

[Redacted signature]

[Redacted name]

Centrale Commissie Dierproeven

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

---

[Redacted address] | Den Haag  
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

---

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

T: 0900 28 000 28





## 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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

|     |                                                  |            |                                 |
|-----|--------------------------------------------------|------------|---------------------------------|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.           | 40100      |                                 |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. |            |                                 |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | Volgnummer | Type dierproef                  |
|     |                                                  | 1          | Vaccinatie/challenge experiment |

*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.

Een vaccinatie-challenge experiment is de standaard aanpak om de effectiviteit van vaccins te testen. Voor het testen van verbeterde/nieuwe influenzavaccins maken we gebruik van influenza muismodellen. Deze modellen hebben in het verleden hun waarde bewezen.

In dit type experiment worden muizen gevaccineerd met verschillende kandidaat-vaccins, variërend in dosis, vaccinatieschema, en toedieningsroute in een toedieningsregime van 1, 2 of 3 keer met 3 of 4 weken interval. Vier weken na de laatste vaccinatie volgt een challenge met influenza virus. De reactie van de muizen op de challenge wordt gedurende 3 weken gevolgd. De experimenten zijn erop gericht om te bepalen wat de optimale en minimale werkzame dosis van het vaccin is, welke vaccinsamenstelling het meest effectief is, en wat het optimale aantal vaccinaties is.

Primaire uitkomstparameters: Lichaamsgewicht, overleving en klinische score.

---

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.

---

Layout van typisch vaccinatie-challenge experiment:

- ca. 1 week acclimatiseren
- Bloedafname (wangprik) bij alle groepen een dag voor vaccinatie voor bepaling antilichaamtiter (preserum).
- Vaccinatie van testgroepen via intramusculaire injectie (dijbeenspier) 1, 2 of 3x met 3 of 4 weken interval.
- D-1: Toediening van CR6261 of CR8020 aan positieve model controlegroep en PBS aan negatieve controlegroep (zie opmerking 1). Bloedafname bij alle groepen voor bepalen antilichaamtiter.
- D0: Intranasale inoculatie van een vastgestelde dosis (zie experiment type 3) influenzavirus (zie opmerking 2), onder narcose.
- D-1 t/m 21: De muizen worden dagelijks gewogen en klinisch beoordeeld. Voor de klinische beoordeling wordt het volgende score systeem gehanteerd: 0 = normale muis; 1 = ruwe vacht, maar net zo actief tijdens handelingen als normale muis; 2 = ruwe vacht (evt. bol/opgerold), minder actief tijdens handelingen; 3 = ruwe vacht (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen; 4 = ruwe vacht (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd. De dieren worden 2x per dag geobserveerd zolang score 3 is gescoord. Dieren, die voortijdig worden geëuthanaseerd/dood gaan, worden ook nog gewogen.
- D21: Einde proef: alle muizen worden geëuthanaseerd. In sommige gevallen worden orgaan of bloedmonsters afgenomen voor analyse

#### Opmerking 1:

De i.v. toediening van antilichaam, welke een 100% bescherming biedt tegen ziekte en sterfte, is bedoeld als modelcontrole en gouden standaard voor bescherming (en de brug naar voorgaande experimenten). De PBS (de negatieve controle) en de i.v. toediening van antilichaam (de positieve controle) geven samen overzicht over het referentiekader van 0% tot 100% bescherming tegen lethale challenge met influenza virus. Zo wordt het gebruikte modelsysteem gecontroleerd op een correcte werking.

#### Opmerking 2:

De toegediende influenzastam varieert, afhankelijk van het te testen vaccin en het stadium van onderzoek. In eerste instantie wordt het vaccin getest met een homologe challenge: de influenzastam is van hetzelfde type als het vaccin. Om te onderzoeken of het vaccin ook kruisbescherming levert, worden de muizen gechallenged met een heterologe virusstam, die een andere typering heeft dan het vaccinvirus. Op dit moment zijn er binnen het Instituut modellen voor een reeks aan influenzatypen beschikbaar, waaronder varianten van seizoensgriep H1N1, H3N2 en influenza B virussen en varianten van de potentieel pandemische H<sub>5</sub>N1 en H<sub>7</sub>N9 virussen van aviaire oorsprong.

In dit type experimenten worden vaccins op de volgende punten geëvalueerd:

- Samenstelling: nieuwe vaccinkandidaten worden vergeleken met de standaarden (welke?) en de leidende vaccinkandidaten.
  - Dosis: de optimale vaccindosis wordt bepaald door een reeks toedieningsdoses te testen.
  - Behandelfrequentie: ook het aantal benodigde toedieningen moet worden bepaald, dit varieert meestal van 1 tot 3 injecties. Tussen vaccinaties moet het immuunsysteem de tijd krijgen om de immuunreactie te laten "rijpen", in 99% van de experimenten wordt een interval van 3 of 4 weken gebruikt.
-

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

De benodigde groepsgrootte wordt bepaald op basis van de resultaten van voorgaande experimenten, waarbij rekening wordt gehouden met de te verwachten bescherming van het vaccin en de uniformiteit van de respons van de muizen op de challenge infectie. Voorafgaand aan elk experiment wordt eerst een statistische analyse gemaakt om de gewenste groepsgroottes te bepalen. Indien mogelijk worden experimenten zodanig opgezet dat meerdere doelstellingen in 1 experiment kunnen worden bekeken, zodat op controle groepen wordt bespaard. Bijvoorbeeld experiment type 1 (vaccinatie/challenge) wordt wanneer mogelijk gecombineerd met andere typen experimenten als b.v. 5 of 6 (aandeel antilichaam component of cellulaire component). De negatieve (onbehandelde) en positieve (antilichaam behandelde) controle groepen kunnen dan worden gebruikt in de analyse van beide experimenten. Zo kan het totale aantal gebruikte dieren binnen het project worden verminderd.

## B. De dieren

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

Diersoort: Muis (*Mus musculus*), vrouwelijke dieren, SPF, zoals in voorgaande experimenten.

Herkomst: van geregistreerd fok/toeleveringsbedrijf.

Geschatte aantallen: aantal dieren in experiment varieert van 50 tot maximaal 300 dieren; gemiddeld 30 studies per jaar met gemiddeld 80 dieren per experiment: 2400 dieren/jaar.

Levensstadia: muizen van ca. 6 weken leeftijd.

## 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.

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 welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging door *in vitro* methoden is met de huidige stand van de wetenschap niet mogelijk, omdat de reactie van een levend wezen en in het bijzonder van het afweersysteem (immuunsysteem) op een vaccin of virus niet gesimuleerd kan worden.

Vermindering: Voordat influenzavaccins worden getest in dieren, worden ze eerst uitvoerig getest in het lab; alleen de meest veelbelovende vaccinkandidaten zullen worden getest in dieren. Hierna wordt het aantal benodigde dieren in de experimenten uitvoerig statistisch doorgerekend, om het aantal dieren te beperken, maar tegelijkertijd wel zekerheid te krijgen dat de gegevens die uit het experiment komen bruikbaar zijn om conclusies uit te trekken (en om zo te

voorkomen dat experimenten herhaald moeten worden). De benodigde groepsgrootte wordt bepaald op basis van de resultaten van voorgaande experimenten, waarbij rekening wordt gehouden met de te verwachten bescherming van het vaccin en de uniformiteit van de respons van de muizen op de challenge infectie. Voor een experiment wordt gedaan wordt eerst een statistische analyse gemaakt om de groepsgroottes te bepalen. Indien mogelijk worden experimenten zodanig opgezet dat meerdere vragen in 1 experiment kunnen worden beantwoord, zodat op controlegroepen bespaard kan worden. Bijvoorbeeld: experiment type 1 (vaccinatie/challenge) wordt gecombineerd met type experiment 5 of 6 (aandeel antilichaam component of aandeel cellulaire component). De negatieve (onbehandelde) en positieve (antilichaam behandelde) controlegroepen kunnen dan worden gebruikt in de analyse van beide experimenten. Zo is het mogelijk om het totaal aantal gebruikte dieren binnen het project te verminderen.

Verfijning: De data gegenereerd in de experimenten worden uitvoerig statisch geanalyseerd. Er worden voortdurend interstudie-analyses en trendanalyses over de verschillende experimentreeksen uitgevoerd om het inzicht in de muismodellen te vergroten en de waargenomen vaccineffecten te kunnen interpreteren (voorbeelden daarvan zijn eerder besproken met de DEC). De uitkomsten van deze analyses spelen een belangrijke rol bij het ontwerp van vervollexperimenten.

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.

- De muizen krijgen ca. 1 week de tijd om te acclimatiseren.
- De muizen worden onder narcose gebracht voor intranasale toediening van virus .
- Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een score systeem (zie onder A), waarbij 3 = ruwe vacht (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen en 4 = ruwe vacht (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.
- Er worden geen nadelige milieueffecten verwacht, de dieren worden gehouden in gespecialiseerde dierfaciliteit met BSL2/BSL3 inperkingsniveau.

## 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.

De vaccins die worden getest zijn over het algemeen bedacht, geproduceerd en gepatenteerd door de opdrachtgever/onderzoekspartner. Deze vaccins zijn ook niet in het bezit van anderen. Daarmee is het vrijwel uitgesloten dat andere partijen precies dezelfde experimenten hebben uitgevoerd. Het komt wel voor dat een bestaand vaccin wordt meegenomen in het experiment ter vergelijking met de nieuwe kandidaatvaccins. Daarnaast volgen de onderzoekers die bij dit project betrokken zijn de wetenschappelijke literatuur.

## 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.

Er worden geen pijnstillers toegepast, omdat dit de resultaten van de proef zal beïnvloeden t.a.v. gedrag (sedatief) en/of klinisch-pathologische verschijnselen (ontstekingsremmend). De onderzoekers willen weten of, wanneer en hoe ziek de gevaccineerde muizen worden na virus challenge.

#### **I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen**

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De muizen kunnen ziek worden, met algehele malaise (bol zitten), verminderde eetlust, ademhalingsproblemen en in het ernstigste geval sterfte.

Verder ondervinden ze ongerief van een aantal experimentele handelingen:

- Bloedafnames, d.m.v. wangprik; 2x 100-150 µl per keer
- Vaccingroepen (inclusief de PBS negatieve controle): i.m. injectie 50 µl in de achterpoot beiderzijds
- Antilichaam (CR6261 of CR8020) behandeling controlegroepen: 1x 200 µl i.v.
- Alle groepen: 1x intranasale toediening influenzavirus onder narcose

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De muizen ontwikkelen een pneumonie t.g.v. de influenzavirus infectie. Experimentele handelingen zijn noodzakelijk voor toediening van virus/vaccin/antilichaam en afname van bloedmonsters.

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

- De dieren worden onder narcose gebracht voor intranasale toediening van het virus.
- Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een score systeem (zie onder A). Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.

#### **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.

Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een score systeem (zie onder A), waarbij 3 = ruwe vacht (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen en 4 = ruwe vacht (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd (=HEP).

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

In de ongevaccineerde negatieve modelcontrole groep (PBS): 80-100% en in de gevaccineerde groepen: gemiddeld 50%. Er zijn soms vaccins die minder goed werken dan verwacht, dan reageren de dieren in het ergste geval bijna gelijk aan ongevaccineerde dieren. Er zijn ook vaccins die perfect beschermen, waardoor de dieren helemaal geen ongerief ondervinden van de influenza infectie. De antilichaam behandelde modelcontrole dieren: 0% kans: het antilichaam geeft volledige bescherming.

#### **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 ongevaccineerde controle dieren ondervinden de nadeligste effecten van de influenza infectie: ernstig;  
Gevaccineerde dieren tonen meer variatie, maar over het algemeen worden de dieren op zijn minst deels beschermd: matig, maar bij uitblijven van bescherming door vaccinatie kan het ernstig zijn; Antilichaam behandelde positieve controle groep: matig. Cumulatief ongerief: schatting tussen 5-25% (afhankelijk van grootte van het experiment, grootte van negatieve controlegroep, effectiviteit van de geteste vaccins) ernstig ongerief, overige dieren: matig ongerief.

### **Einde experiment**

#### **L. Wijze van doden**

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

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Bij deel van experimenten worden organen (b.v. milt, lymfeknopen, lever, hersenen) en/of bloedvolume van muis gemonsterd voor analyse, deze bemonstering is niet verenigbaar met het in leven laten van de dieren. In de overige gevallen zijn de dieren vanwege de veranderde immuunstatus en

blootstelling aan een infectieus agens niet opnieuw te gebruiken en zullen de dieren worden geëuthanaseerd om de proef te beeindigen

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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

| 1.1        | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.           | 40100                                                                                                           |            |                |   |                   |
|------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|----------------|---|-------------------|
| 1.2        | Vul de naam van de instelling of organisatie in. |                                                                                                                 |            |                |   |                   |
| 1.3        | Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | <table><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr><tr><td>2</td><td>Adaptatie in muis</td></tr></table> | Volgnummer | Type dierproef | 2 | Adaptatie in muis |
| Volgnummer | Type dierproef                                   |                                                                                                                 |            |                |   |                   |
| 2          | Adaptatie in muis                                |                                                                                                                 |            |                |   |                   |

*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 zoektocht naar vaccins tegen influenza is het noodzakelijk om diermodellen te hebben om de kandidaatvaccins in te testen. Bescherming door een vaccin tegen de ene influenzastam garandeert geen bescherming tegen een andere influenzastam. Om deze reden moet de effectiviteit van deze vaccins tegen verschillende stammen getest worden om inzicht te krijgen in de breedte (de hoeveelheid verschillende influenza stammen) van de bescherming. Hiervoor maken we gebruik van influenza infectiemodellen in de muis. Vaak moeten influenzavirussen eerst aan muizen worden aangepast, voordat ze bij muizen een klinische infectie veroorzaken. Smirnov *et al.* (2000) beschrijven dat ze 23 long-long passages nodig hadden om een pneumovirulente stam te produceren. Brown *et al.* (2001) hadden 20 passages nodig voor adaptatie van een H3N2 stam. Anderen geven echter aan dat met sommige stammen ook al



na 5-10 passages adaptatie kan zijn bereikt. Eerder slaagden we er met H7 in om al na 3 passages een hoog-virulent virus te genereren. In dit experiment wordt rekening gehouden met in totaal 20 passages per virusstam.

Primaire uitkomstparameters: Lichaamsgewicht, klinische score, virustiters in de longen.

#### Referenties:

- Smirnov YA, Lipatov AS, Van Beek R, Gitelman AK, Osterhaus AD, Claas EC (2000). Characterization of adaptation of an avian influenza A (H5N2) virus to a mammalian host. Acta Virol. 44:1-8.
- E. G. Brown, H. Liu, L. Chang Kit, S. Baird & M. Nesrallah (2001). Pattern of mutation in the genome of influenza A virus on adaptation to increased virulence in the mouse lung: Identification of functional themes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6883-6888.

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.

Lay-out van typisch adaptatie experiment:

Twee groepen van elk 3 muizen worden intranasaal geïnfecteerd met twee virusverdundingen. Na 3-5 dagen (afhankelijk van de influenzastam) worden de muizen geëuthanaseerd en worden de longen verzameld. Het longmateriaal wordt in het lab gebruikt om het inoculum voor passage 2 te prepareren en passage 1 te titreren. Daarna wordt een tweede set muizen geïnfecteerd met 50 µl virusmateriaal geïsoleerd uit de longen van de voorgaande infectie. Na 3-5 dagen worden de muizen geëuthanaseerd en worden de longen verzameld. Het longmateriaal wordt in het lab gebruikt om het inoculum voor passage 3 te prepareren. Ook wordt de virustiter van passage 2 bepaald, etc. Er worden maximaal 20 passages uitgevoerd. Op het moment dat de eerste klinische verschijnselen optreden, zal een extra set van 3 muizen worden geïnfecteerd. Deze muizen worden gedurende 10-14 dagen gevolgd om te zien in welke mate de dieren ziek worden/ of het virus al aan de muis is aangepast.

De muizen worden dagelijks gewogen en klinisch beoordeeld volgens het volgende score systeem : 0 = normale muis; 1 = ruwe vacht, maar net zo actief tijdens handelingen als normale muis; 2 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), minder actief tijdens handelingen; 3 = ruwe vacht, (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen; 4 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd. De dieren worden 2x per dag geobserveerd zolang score 3 is gescoord. Dieren, die voortijdig worden geëuthanaseerd/dood gaan, worden ook nog gewogen.

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

Er worden 2 parallelle passages (elk 3 dieren) uitgevoerd, waarbij met 2 verschillende doses wordt gestart, omdat een geslaagde adaptatie afhankelijk kan zijn van de initiële dosis. Elke groep bestaat uit 3 dieren, zodat de kans dat virus aanslaat niet van het individuele dier afhangt. Er wordt gestreefd naar zo gering mogelijk aantal passages, om het aantal mutaties t.o.v. het uitgangsvirus zo veel mogelijk te beperken.

#### **B. De dieren**

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

Diersoort: Muis (*Mus musculus*), vrouwelijke dieren, SPF, zoals in alle voorgaande experimenten.

Herkomst: van geregistreerd fok/toeleveringsbedrijf.

Geschatte aantallen: gemiddeld 1 studie per jaar met gemiddeld 6-8 passages en 6 dieren (2x3) per passage en 1 extra set van 3 dieren: ca. 45 dieren/jaar.

Levensstadia: muizen van ca. 6-8 weken leeftijd.

### 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.

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 welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging door in vitro methoden is met de huidige stand van de wetenschap niet mogelijk, omdat de reactie van een levend wezen en in het bijzonder van het afweersysteem (immuunsysteem) op een virus niet gesimuleerd kan worden. Bij passage in cel- of eikweek blijkt vaak dat het virus juist wordt geattenuëerd.

Vermindering: Het experiment wordt uitgevoerd met een klein aantal dieren, maar de ervaring leert dat het voldoende is om een succesvolle adaptatie te kunnen uitvoeren en telkens voldoende longmateriaal te kunnen oogsten voor de volgende passage. Bij elke passage neemt de kans op mutaties in het genoom van het influenza virus toe. Om zo dicht mogelijk bij het originele virus te blijven, wordt het aantal passages in muizen, en daarmee ook het aantal benodigde dieren, zo laag mogelijk gehouden.

Verfijning: Door ervaringen uit voorgaande adaptatie experimenten, met name t.a.v. de vereiste initiële dosis, is de kans op een succesvolle, snelle adaptatie sterk toegenomen.

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.

- De muizen krijgen ca. 1 week de tijd om te acclimatiseren.
- Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een scoresysteem, waarin 3 = ruwe vacht, (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen, en 4 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score = 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.
- Er worden geen nadelige milieueffecten verwacht, de dieren worden gehouden in gespecialiseerde dierfaciliteit met BSL2/BSL3 inperkingsniveau.

## 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.

De wetenschappelijke literatuur op dit onderwerp wordt gevolgd door de bij dit project betrokken wetenschappers. Als blijkt dat de benodigde influenza virusstam elders al is geadapteerd, wordt deze opgevraagd. Dit heeft de voorkeur (en in het verleden is zo'n muis-geadapteerde virusstam ook bij collega's opgevraagd), omdat het zekerheid geeft dat een bruikbaar model kan worden verkregen en ook omdat het minder dieren en minder tijd kost.

## 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 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.

Er worden geen pijnstillers toegepast, omdat dit de resultaten van de proef zal beïnvloeden t.a.v. gedrag: (sedatief) en/of klinisch-pathologische verschijnselen (ontstekingsremmend). De onderzoekers willen weten of, wanneer en hoe ziek de muizen worden na toediening van het virus.

☐ Ja

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- Muizen kunnen ziek worden, met algehele malaise (bol zitten), verminderde eetlust, ademhalingsproblemen en in het ernstigste geval sterfte.
- De muizen worden onder narcose gebracht voor intranasale toediening van het virus.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Dit is het gevolg van de infectie met influenzavirus.

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

De meeste muizen worden al geëuthanaseerd (op dag 3-5 p.i.) voordat (ernstige) klinische verschijnselen optreden. Verderop in het adaptatieproces wordt een set van 3 muizen langere tijd gevolgd om juist te zien wat de gevolgen van de infectie met het virus uit de betreffende passage zijn. In deze periode worden de dieren dagelijks klinisch beoordeeld volgens bovenstaand scoresysteem (zie onder A). Bij score = 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.

### 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.

Muizen die langere tijd worden gevolgd (zie onder I) zullen ernstige klinische verschijnselen ontwikkelen. Ze worden geëuthanaseerd bij score 4 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd (= HEP).

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

Het gaat waarschijnlijk om 1 of 2 sets van 3 muizen: ca. 7-13% van het totaal aantal dieren (gemiddeld 45).

### 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.

Cumulatieve ongerief: ernstig.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Het oogsten van de longen voor isolatie van het virus is noodzakelijk voor het in handen krijgen van het geadapteerde virus, deze bemonstering is niet verenigbaar met het in leven laten van de dieren.

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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 40100

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

| Volgnummer | Type dierproef             |
|------------|----------------------------|
| 3          | Bepaling van infectiedosis |

*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.

Na de adaptatie van het virus aan de muis (experiment type 2) is het nodig om de optimale infectiedosis van het geadapteerde virus in de muis te bepalen. Deze bepaling is ook nodig bij de overgang van een oude (uitgeputte) voorraad virus naar een nieuw-geproduceerde voorraad om te bepalen of de karakteristieken van het model (door mutaties in het virus tijdens de productie van de nieuwe stock) wel/niet zijn veranderd en vast te stellen dat de experimenten die zijn uitgevoerd met de oude voorraad vergelijkbaar zijn met die van de nieuwe voorraad.

Primaire uitkomstparameters: Lichaamsgewicht, overleving en klinische score.

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.

Layout van typisch dosis-bepaling experiment

- 1 week acclimatiseren
- Op D0 worden de muizen, 5 of 6 groepen, 10 dieren per groep, intranasaal geïnoculeerd met verschillende oplopende concentraties influenzavirus. Daarvoor worden de dieren eerst onder narcose gebracht.
- Vanaf D-1 t/m D14 worden de muizen dagelijks gewogen en klinisch beoordeeld. Voor de klinische beoordeling wordt het volgende score systeem gehanteerd: 0 = normale muis; 1 = ruwe vacht, maar net zo actief tijdens handelingen als normale muis; 2 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), minder actief tijdens handelingen; 3 = ruwe vacht, (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen; 4 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd. De dieren worden 2x per dag geobserveerd zolang score 3 is gescoord.
- Dieren, die voortijdig worden geëuthanaseerd/ dood gaan, worden eerst gewogen en dan naar het lab gestuurd. Daar zal worden gekeken of de longen zijn aangetast.
- Op D14 worden de overgebleven muizen geëuthanaseerd en verbloed.

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

In het verleden is gebleken dat 10 dieren per groep garandeert dat er bruikbare data worden gegenereerd, die gebruikt kunnen worden om de optimale infectie dosis te bepalen. Afhankelijk van de titer van de muis-geadapteerde virusstock kan met 5 of 6 groepen een sigmoïde responscurve worden verkregen, waarbij in het beste geval een plateau optreedt bij 0 en 100% overleving (niet zo relevant omdat er toch een dosis in het 100% sterfte plateau wordt gebruikt?). Met 10 dieren per groep kan 10% verschil (=1 muis) in reactiviteit tussen de groepen worden gevonden. Het is gebleken dat de data zo betrouwbaar zijn dat met één dosistitratie experiment (per virus) kan worden volstaan.

## B. De dieren

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

Diersoort: Muis (*Mus musculus*), vrouwelijke dieren, SPF, zoals in alle voorgaande experimenten.

Herkomst: van geregistreerd fok/toeleveringsbedrijf

Geschatte aantallen: max. 60 dieren per experiment; in de afgelopen jaren: gemiddeld 1 studie per jaar met gemiddeld 60 dieren per experiment: 60 dieren/jaar

Levensstadia: muizen van ca. 6 weken leeftijd. In sommige gevallen wordt het experiment ook uitgevoerd met oudere muizen (12+ weken), om leeftijdseffecten uit te sluiten/controleren.

## 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.

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 welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging door in vitro methoden is met de huidige stand van de wetenschap niet mogelijk, omdat de reactie van een levend wezen en in het bijzonder van het afweersysteem (immuunsysteem) op een virus infectie niet gesimuleerd kan worden.

Vermindering: Op basis van eerdere resultaten kan worden verwacht dat het aantal gebruikte proefdieren en dosisgroepen voldoende is, maar niet disproportioneel, om in één experiment te bepalen welke dosis moet worden gebruikt voor challenge in vervolgstudies met reproduceerbare resultaten. Om te voorkomen dat frequent nieuwe batches van een muis-geadapteerd virus in muizen moeten worden getest, worden steeds stocks geproduceerd die voldoende zijn voor minstens 5 jaar experimenteel onderzoek.

Verfijning: Het influenza muismodel is in de wetenschappelijke wereld geaccepteerd als geschikt model voor het testen van vaccins en antivirale middelen voor toepassing in de mens in de eerste fase van het onderzoek. De ervaring met dit type experimenten heeft geleerd welke dosisreeks het beste kan worden getest om voor het vervolgonderzoek direct bruikbare resultaten op te leveren.

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.

- De muizen krijgen ca. 1 week de tijd om te acclimatiseren.
- Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een scoresysteem, waarin 3 = ruwe vacht, (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen, en 4 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score = 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.
- Er worden geen nadelige milieueffecten verwacht, de dieren worden gehouden in gespecialiseerde dierfaciliteit met BSL2/BSL3 inperkingsniveau.

### **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.

Ook in geval van overgang naar een nieuwe virusstock alsmede bij implementatie van een infectiemodel dat van derden afkomstig is, wordt (opnieuw) een dosis-respons experiment uitgevoerd (zie onder A).



## 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.

Er worden geen pijnstillers toegepast, omdat dit de resultaten van de proef zal beïnvloeden t.a.v. gedrag (sedatief) en/of klinisch-pathologische verschijnselen (ontstekingsremmend). De onderzoekers willen weten of, wanneer en hoe ziek de muizen worden van de toegediende dosis virus.

☐ Ja

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- Muizen worden meer of minder ernstig ziek met verschijnselen van algehele malaise (bol zitten), verminderde eetlust, ademhalingsproblemen en in het ernstigste geval sterfte.
- Muizen ondervinden daarnaast ongerief van de experimentele handelingen: intranasale toediening van het virus onder anesthesie.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Ziekte is het gevolg van de influenza infectie en afhankelijk van de toegediende virusdosis.

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

- Voor de intranasale toediening van virus worden de muizen eerst onder narcose gebracht.
- Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens het bovenstaand scoresysteem (zie onder A). Bij score = 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.

#### **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.

Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een scoresysteem, waarin 3 = ruwe vacht, (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen, en 4 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd (= HEP).

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

Naarmate de dosis virus hoger is, zal het ongerief dat de dieren ondervinden toenemen. In de 1 of 2 groepen blootgesteld aan de hoogste doses gaat het om 90-100%. Bij lagere doses zal dit percentage evenredig meer of minder sterk afnemen, afhankelijk van de virusstam. In de laagste dosishoogte kan matig tot ernstig ongerief worden verwacht bij 0-20% van de dieren.

#### **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.

Dieren, die de hoogste dosis virus krijgen toegediend, ondervinden de nadeligste effecten van de influenzavirus infectie: ernstig. Bij lagere virusdoses zal de mate van ongerief afnemen tot matig. Het is niet goed te voorspellen bij welke dosis de omslag van ernstig naar matig ongerief ligt. Cumulatief ongerief: ernstig.

### **Einde experiment**

#### **L. Wijze van doden**

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

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Een deel van de dieren zal waarschijnlijk sterven aan de gevolgen van de influenza infectie. Overlevende dieren worden aan het einde van de proef geëuthanaseerd, hergebruik binnen dit project is uitgesloten omdat de immuunstatus van de dieren door blootstelling aan influenzavirus is veranderd. Deze

influenzavirussen zijn ook besmettelijk voor mensen.

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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

| 1.1        | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.           | 40100                                                                                                                                       |            |                |   |                                               |
|------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|----------------|---|-----------------------------------------------|
| 1.2        | Vul de naam van de instelling of organisatie in. |                                                                                                                                             |            |                |   |                                               |
| 1.3        | Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | <table><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr><tr><td>4</td><td>Bepaling van dynamische bereik influenzamodel</td></tr></table> | Volgnummer | Type dierproef | 4 | Bepaling van dynamische bereik influenzamodel |
| Volgnummer | Type dierproef                                   |                                                                                                                                             |            |                |   |                                               |
| 4          | Bepaling van dynamische bereik influenzamodel    |                                                                                                                                             |            |                |   |                                               |

*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 experiment is bedoeld om te controleren of het infectiemodel met de nieuw verkregen, muis-geadapteerde influenzastock (geproduceerd in experiment type 2) zich volgens verwachting "gedraagt" na toediening van een antilichaam met virus-neutraliserende eigenschappen. Daartoe worden muizen voor de challenge behandeld met een antilichaam dat 100% bescherming geeft of met PBS, waarna 0% bescherming optreedt. Deze behandelgroepen lopen in alle vaccinatie/challenge experimenten als controles mee om de integriteit van de influenzamodellen te bewaken en een vergelijking van de gegevens uit verschillende experimenten mogelijk te maken.

Primaire uitkomstparameters: Lichaamsgewicht, overleving en klinische score.

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.

Lay-out van typische bepaling van dynamische bereik:

- 1 week acclimatiseren
- Op D-1 worden 2 groepen met 8 tot 10 dieren (aantal dieren per groep hangt af van virulentie van de gebruikte influenza stam), behandeld met antilichaam voor influenza A virussen behorend tot groep I, voor influenza A virussen behorend tot groep II of CR9xxx in geval van een influenza B virus). Twee andere groepen met elk eveneens 8 tot 10 dieren worden behandeld met PBS.
- Op D0 worden 1 antilichaam behandelde groep en 1 onbehandelde groep intranasaal geïnoculeerd (onder narcose) met hoge concentratie influenza virus (50 µl). Elke andere behandelde en onbehandelde groep krijgt een lage concentratie influenza virus toegediend. De hoge concentratie en de lage concentratie zijn de twee gestandaardiseerde influenza doses die worden toegepast in alle experimenten.
- Vanaf D-1 t/m D14 worden de muizen dagelijks gewogen en klinisch beoordeeld. Voor de klinische beoordeling wordt het volgende score systeem gehanteerd: 0 = normale muis; 1 = ruwe vacht, maar net zo actief tijdens handelingen als normale muis; 2 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), minder actief tijdens handelingen; 3 = ruwe vacht, (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen; 4 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. De dieren worden 2x per dag geobserveerd zolang score 3 is gescoord. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.
- Op D14 worden de overgebleven muizen geëuthanaseerd.

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

In het verleden is gebleken dat 8 tot 10 dieren per groep garandeert dat er bruikbare data worden gegenereerd, die het mogelijk maken om te controleren of het influenza muismodel binnen de verwachte bandbreedte presteert (100% bescherming na antilichaambehandeling en 0% bescherming na PBS behandeling). Aantal dieren per groep wordt bepaald aan de hand van de data, die voortkomen uit de "optimale dosisebepaling" (type 3).

## B. De dieren

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

Diersoort: Muis (*Mus musculus*), vrouwelijke dieren, SPF, zoals in alle voorgaande experimenten.

Herkomt: van geregistreerd fok/toeleveringsbedrijf

Geschatte aantallen: max. 40 dieren per experiment; in de afgelopen jaren: gemiddeld 1 studie per jaar met 40 dieren per experiment: 40 dieren/jaar

Levensstadia: muizen van ca. 6 weken leeftijd. In sommige gevallen wordt het experiment uitgevoerd met oudere muizen (12+ weken), om leeftijdseffecten uit te sluiten/controleren.

## 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.

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 door in vitro methoden is met de huidige stand van de wetenschap niet mogelijk, omdat de reactie van een levend wezen en in het bijzonder van het afweersysteem (immuunsysteem) op een virus infectie niet gesimuleerd kan worden.

Vermindering: Op basis van eerdere resultaten kan worden verwacht dat het aantal gebruikte proefdieren en dosisgroepen voldoende is, maar niet disproportioneel, om in één experiment te bepalen of de 0% en 100% beschermingscontroles (=definitie dynamisch bereik) aan de verwachting voldoen.

Verfijning: Het influenza muismodel is in de wetenschappelijke wereld geaccepteerd als geschikt model voor het testen van vaccins en antivirale middelen voor toepassing in de mens in de eerste fase van het onderzoek. Binnen het instituut wordt al meer dan tien jaar intensief gewerkt met influenza muismodellen, waarvan de meesten binnen het instituut zijn ontwikkeld. We hebben deze modellen in het beginstadium uitgebreid geëvalueerd en zo goed mogelijk gestandaardiseerd en zijn nu in staat om consistente uitkomsten te produceren.

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.

- De muizen krijgen ca. 1 week de tijd om te acclimatiseren.
- Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een scoresysteem, waarin 3 = ruwe vacht, (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen, en 4 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score = 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.
- Er worden geen nadelige milieueffecten verwacht, de dieren worden gehouden in gespecialiseerde dierfaciliteit met BSL2/BSL3 inperkingsniveau.

### **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.

Dit experiment wordt uitgevoerd bij het opzetten van nieuwe influenza muismodellen en ook bij het in gebruik nemen van een nieuwe virusbatch, omdat niet op voorhand valt uit te sluiten dat bij het opnieuw opkweken van het muis-geadapteerde virus andere mutaties optreden dan in de oorspronkelijke batch. In zo'n geval kan het virus zich in de muis anders gaan "gedragen". Het is ook nodig bij implementatie van bestaande influenza muismodellen die overgenomen worden van een ander laboratorium, omdat is gebleken dat experimentele factoren zoals b.v. wijze van virustoediening, diepte van de narcose, en variatie tussen muizenstammen van invloed kunnen zijn op de uitkomst.

## 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.

Er worden geen pijnstillers toegepast, omdat dit de resultaten van de proef zal beïnvloeden t.a.v. gedrag (sedatief) en/of klinisch-pathologische verschijnselen (ontstekingsremmend). De onderzoekers willen weten of, wanneer en hoe ziek de muizen worden van de toegediende dosis virus, met of zonder profylactische behandeling met neutraliserend antilichaam.

☐ Ja

## I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- Muizen worden ziek met algehele malaise (bol zitten), verminderde eetlust, ademhalingsproblemen en in het ernstigste geval sterfte.
- Muizen ondervinden daarnaast ongerief van de experimentele handelingen:
  - In alle groepen: i.v. injectie van antilichaam of PBS
  - In alle groepen: intranasale toediening van influenzavirus onder anesthesie

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Ziekte is het gevolg van de influenza infectie.

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

- Voor de intranasale toediening van virus worden de muizen eerst onder narcose gebracht.
- Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens het bovenstaand scoresysteem (zie onder A). Bij score = 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.

## 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.

Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een scoresysteem (zie onder A), waarin 3 = ruwe vacht, (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen, en 4 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd (= HEP).

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

Naar verwachting zullen de antilichaam-behandelde groepen 0% kans hebben, want deze zijn volledig beschermd. De PBS-behandelde groepen hebben 80%-100% kans.

## 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.

Alle dieren in de negatieve, PBS behandelde controle groep ondervinden de nadeligste effecten van de influenza infectie: ernstig, terwijl alle dieren in de positieve, antilichaam-behandelde groep beschermd zijn en hoogstens matig ongerief zullen ondervinden. Cumulatief ongerief: ernstig.

**Einde experiment**



**L. Wijze van doden**

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

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Overlevende dieren worden geëuthanaseerd ter beëindiging van de proef. Door de blootstelling aan influenza virus is de immuunstatus van deze dieren veranderd en zijn zij voor andere experimenten binnen dit project onbruikbaar geworden.

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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

|     |                                                  |            |                               |
|-----|--------------------------------------------------|------------|-------------------------------|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.           | 40100      |                               |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. |            |                               |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | Volgnummer | Type dierproef                |
|     |                                                  | 5          | Aandeel antilichaam component |

*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.

Om vast te stellen wat het aandeel van de door vaccinatie geïnduceerde antilichamen is in de beschermende werking van de vaccins, wordt het volgende tweedelige experiment uitgevoerd. In het eerste deel worden muizen geïmmuniseerd met kandidaat vaccins van interesse. Vier weken na de laatste vaccinatie worden de dieren niet geïnoculeerd met influenzavirus voor challenge, maar verbloed om het serum te oogsten. Dit serum wordt in het tweede deel intravasculair in nieuwe immunologisch naïeve (muizen die nog nooit aan influenza zijn blootgesteld) muizen gespoten. Deze muizen worden vervolgens met influenzavirus geïnfecteerd. De mate waarin de tweede groep muizen wordt beschermd is het gevolg van de door vaccinatie in de eerste groep muizen

opgewekte antilichamen. Deze kennis kan samen met de uitkomsten die in experiment type 6 (Bepaling cellulaire component) worden verkregen bijdragen aan verdere verbetering van het vaccin.

Primaire uitkomstparameters: Lichaamsgewicht, overleving en klinische score.

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.

Layout van deel I:

- ca. 1 week acclimatiseren
- Bloedafname bij alle groepen een dag voor elke vaccinatie voor bepaling van de antilichaamtiter.
- Vaccinatie van testgroepen: intramusculaire injectie 50 µl in alle twee de achterpoten (dijbeenspier), 1, 2 of 3x met 3 of 4 weken interval;
- D= 0: De dieren worden onder narcose gebracht en verbloed. Terminale bloedafname vindt plaats via orbitale sinus, omdat deze methode de grootste opbrengst geeft.
- De dag voor aanvang van de studie, op de dagen van vaccinatie en direct voor het verbloeden worden de dieren gewogen en klinisch beoordeeld. Voor de klinische beoordeling wordt het volgende scoresysteem gehanteerd: 0 = normale muis; 1= ruwe vacht, maar net zo actief tijdens handelingen als normale muis; 2 = ruwe vacht (evt. bol/opgerold), minderactief tijdens handelingen; 3 = ruwe vacht (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen; 4 = ruwe vacht (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd. De dieren worden 2x per dag geobserveerd zolang score 3 is gescoord.

In sommige gevallen is alleen uitvoering van het eerste deel nodig, omdat het opgewekte serum gebruikt wordt voor *in vitro* analyses of in een ander Instituut in muizen wordt getest.

Layout van deel II:

- ca. 1 week acclimatiseren
- D-1: - Alle serumbehandelgroepen: afname nulbloed m.b.v. wangprik en toediening serum i.p.
- - Antilichaamtoediening (CR6261 of CR8020) positieve controle groep, PBS toediening negatieve controle groep (zie opmerking 1).
- D0: Intranasale inoculatie van influenzavirus (zie opmerking 2), onder narcose.
- D-1 t/m 21: De muizen worden dagelijks gewogen en klinisch beoordeeld, volgens bovenstaand scoresysteem. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd. De dieren worden 2x per dag geobserveerd zolang score 3 is gescoord. Dieren, die voortijdig worden geëuthanaseerd/ dood gaan, worden ook nog gewogen.
- D21: De muizen worden geëuthanaseerd.

#### Opmerking 1:

De i.v. toediening van antilichaam, welke 100% bescherming biedt tegen ziekte en sterfte, is bedoeld als modelcontrole en gouden standaard voor bescherming (en de brug naar voorgaande en toekomstige experimenten). Deze positieve controle groep geeft samen met de negatieve PBS controle groep overzicht over het referentiekader van 0% tot 100% bescherming tegen lethale challenge met influenza virus. Zo wordt het gebruikte modelsysteem gecontroleerd op een correcte werking.

#### Opmerking 2:

De toegediende influenzastam varieert, afhankelijk van het gebruikte vaccin en het stadium van onderzoek. In eerste instantie wordt het serum getest in een homologe challenge: de influenzastam is van hetzelfde type als het vaccin. Om te onderzoeken of het serum ook kruisbescherming levert, worden de muizen gechallenged met een heterologe virusstam, die een andere typering heeft dan het vaccinvirus. Op dit moment zijn er modellen voor verschillende influenzatypen beschikbaar, waaronder varianten van H1N1, H3N2, H5N1, H7N7 en influenza B virussen.

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

Voor deel I en II geldt dat de benodigde groepsgrootte wordt bepaald op basis van de resultaten van voorgaande experimenten, waarbij rekening wordt gehouden met de te verwachten bescherming van het vaccin en de uniformiteit van de respons van de muizen op de challenge infectie. Voor deel I geldt tevens dat de groepsgrootte afhangt van de hoeveelheid serum die nodig is voor uitvoering van het vervollexperiment(en).

Indien mogelijk worden experimenten zodanig opgezet dat meerdere doelstellingen in 1 experiment bekeken kunnen worden, zodat op controle groepen wordt bespaard. Bijvoorbeeld: experiment type 1 (vaccinatie/challenge) wordt gecombineerd met type 5 (aandeel antilichaam component). De negatieve (onbehandelde) en positieve (antilichaam behandelde) controle groepen kunnen dan worden gebruikt in de analyse van beide experimenten. Zo kan het totale aantal gebruikte dieren binnen het project worden verminderd.

#### **B. De dieren**

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

Diersoort: Muis (*Mus musculus*), vrouwelijke dieren, SPF, zoals in alle voorgaande experimenten.

Herkomst: van geregistreerd fok/toeleveringsbedrijf.

Geschatte aantallen: naar schatting zullen er 5 experimenten met geschat 50 dieren per jaar worden uitgevoerd: 250 dieren per jaar.

Levensstadia: dieren van ca. 6 weken leeftijd. In sommige gevallen zullen oudere muizen (12+ weken) worden gebruikt om leeftijdseffecten uit te sluiten/te controleren.

#### **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.

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 welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging door *in vitro* methoden is met de huidige stand van de wetenschap niet mogelijk, omdat de reactie van een levend wezen en in het bijzonder van het afweersysteem (immuunsysteem) op een vaccin of virus niet gesimuleerd kan worden.

Vermindering: De benodigde groepsgrootte wordt bepaald op basis van de resultaten van voorgaande experimenten, waarbij rekening wordt gehouden met de te verwachten bescherming van het vaccin en de uniformiteit van de respons van de muizen op de challenge infectie. Indien mogelijk worden experimenten zodanig opgezet dat meerdere doelstellingen in 1 experiment vastgesteld worden, zodat op controle groepen bespaard kan worden. Bijvoorbeeld experiment type 1 (vaccinatie/challenge) wordt gecombineerd met type 5 (aandeel antilichaam component). De negatieve (onbehandelde) en positieve (antilichaam behandelde) controle groepen kunnen dan worden gebruikt in de analyse van beide experimenten. Zo is het mogelijk om het totale aantal gebruikte dieren binnen het project te verminderen..

Verfijning: De data gegenereerd in de experimenten worden uitvoerig statistisch geanalyseerd. Er worden voortdurend interstudie-analyses en trendanalyses over de verschillende experimentreeksen uitgevoerd ter vergroting van het inzicht in de muismodellen en de werking van de vaccins (voorbeelden daarvan zijn eerder besproken met de DEC). De uitkomsten van deze analyses spelen een belangrijke rol bij het ontwerp van vervollexperimenten.

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.

- De muizen krijgen ca. 1 week de tijd om te acclimatiseren.
- Voor toediening van virus worden de muizen onder narcose gebracht.
- Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een score systeem (zie onder A), waarbij 3 = ruwe vacht (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen en 4 = ruwe vacht (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.
- Er worden geen nadelige milieueffecten verwacht, de dieren worden gehouden in gespecialiseerde dierfaciliteit met BSL2/BSL3 inperkingsniveau.

## 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.

De vaccins die worden getest zijn over het algemeen bedacht, gepatenteerd en geproduceerd door de opdrachtgever. Deze vaccins zijn ook niet in het bezit van anderen. Het is vrijwel uitgesloten dat andere partijen dezelfde experimenten hebben uitgevoerd. De onderzoekers die bij dit project betrokken zijn volgen dit in de wetenschappelijke literatuur.

## 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.

Er worden geen pijnstillers toegepast, omdat dit de resultaten van de proef zal beïnvloeden t.a.v. gedrag (sedatief) en/of klinisch-pathologische verschijnselen (ontstekingsremmend). De onderzoekers willen weten of, wanneer en hoe ziek de muizen worden van de toegediende dosis virus, na passieve immunisatie.

☐ Ja

#### **I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen**

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- De muizen kunnen ziek worden, met algehele malaise (bol zitten), verminderde eetlust, ademhalingsproblemen en in het ernstigste geval sterfte.
- Verder ondervinden ze ongerief van een aantal experimentele handelingen:
  - Deel I:
    - Bloedafname (wangprik) voor elke vaccinatie: max. 3x, 100-150 µl per keer, verbloed op D0 via orbitale sinuspunctie onder narcose
    - Vaccingroepen: max. 3x (D-70, D-49, D-28) injectie 50 µl in de dijbeenspier, beiderzijds.
  - Deel II:
    - Serumbehandelgroepen: serumtoediening i.p.
    - Antilichaam/PBS toediening controlegroepen: 1x 200 µl i.v.
    - Alle groepen: intranasale toediening (50 µl) influenzavirus onder narcose

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De muizen ontwikkelen een pneumonie t.g.v. de influenzavirus infectie. Experimentele handelingen zijn noodzakelijk voor toediening van virus/vaccin/antilichaam en afname van bloedmonsters.

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

- Voor toediening van virus en voor bloedafname worden de muizen onder narcose gebracht.
- De muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een score systeem (zie onder A). Bij score = 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.

#### **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.

Deze omstandigheden worden alleen in deel II verwacht. De muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een scoresysteem (zie onder A), waarbij 3 = ruwe vacht (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen en 4 = ruwe vacht (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd (=HEP).

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

Deel I: 0% van de dieren.

Deel II: De serumbehandelde dieren tonen meer variatie: van 0% tot 100%, afhankelijk van het beschermend vermogen van het overgedragen serum.

Negatieve controlegroep: 80-100% kans. Antilichaam controle groep: 0% kans, het antilichaam geeft volledige bescherming.

#### **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 negatieve controle dieren ondervinden de nadeligste effecten van de influenza infectie: ernstig; antilichaam-behandelde controlegroep: matig.

Serumbehandelde dieren tonen meer variatie, maar over het algemeen worden de dieren op zijn minst ten dele beschermd: matig, maar bij uitblijven van bescherming kan het ongerief oplopen tot ernstig.

Cumulatief ongerief: ernstig.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Overlevende dieren worden aan het einde van de proef geëuthanaseerd, omdat door de blootstelling aan influenzavirus de immuunstatus van deze dieren is veranderd en zij voor ander onderzoek onbruikbaar geworden zijn. In sommige gevallen worden dieren aan het eind van de proef gedood om organen (b.v. milt, lymfeknopen, lever, hersenen) en/of bloed te verzamelen voor nader onderzoek.

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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

| 1.1        | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.           | 40100                                                                                                                      |            |                |   |                              |
|------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|----------------|---|------------------------------|
| 1.2        | Vul de naam van de instelling of organisatie in. |                                                                                                                            |            |                |   |                              |
| 1.3        | Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | <table><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr><tr><td>6</td><td>Aandeel cellulaire component</td></tr></table> | Volgnummer | Type dierproef | 6 | Aandeel cellulaire component |
| Volgnummer | Type dierproef                                   |                                                                                                                            |            |                |   |                              |
| 6          | Aandeel cellulaire component                     |                                                                                                                            |            |                |   |                              |

*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.

Om het aandeel van de cellulaire component van het immuunsysteem te bepalen, worden de muizen behandeld met antilichamen, die specifiek delen van het cellulaire immuunsysteem (CD4 en/of CD8 specifieke T cellen) uitschakelen (celdepletie). De dieren worden gevaccineerd en vervolgens geïnfecteerd met influenza virus, zoals beschreven in experiment type 1. In dit experiment worden ze net voor de challenge infectie behandeld met een T cel depleterend antilichaam. Het verschil in bescherming tussen de muizen die wel en niet behandeld zijn met zo'n T cel antilichaam geeft het aandeel weer van het uitschakelde deel van het immuunsysteem in de beschermende werking van het vaccin. Deze kennis kan bijdragen aan verdere verbetering van het vaccin.

Primaire uitkomstparameters: Lichaamsgewicht, overleving en klinische score.

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.

Layout van typisch cellulair immuniteitsexperiment:

- ca. 1 week acclimatiseren
- D-29: Bloedafname (wangprik) voor bepaling van de antilichaamtiter (preserum) van alle groepen.
- D-28: Vaccinatie van experimentele groepen (en negatieve controle (PBS) groep: intramusculaire (i.m.) injectie in dijbeenspier
- D-4, -3 en -2: Toediening van 500 µl i.p. T cel depleterende antilichamen (of controle antilichaam) aan betreffende groepen.
- D-1: Toediening van 500 µl i.p. T cel depleterende antilichamen (of controle antilichaam) aan betreffende groepen.  
Toediening van i.v. 200 µl CR6261 of CR8020 aan antilichaam controlegroep (zie opmerking 1).
- D0: Bloedafname voor serologisch onderzoek.  
Intranasale inoculatie (50 µL) met een vastgestelde dosis influenzavirus (zie opmerking 2).
- D-1 t/m 21: De muizen worden dagelijks gewogen en klinisch beoordeeld. Voor de klinische beoordeling wordt het volgende score systeem gehanteerd:  
0 = normale muis; 1= ruwe vacht, maar net zo actief tijdens handelingen als normale muis; 2 = ruwe vacht (evt. bol/opgerold), minder actief tijdens handelingen; 3 = ruwe vacht (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen; 4 = ruwe vacht (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd.  
Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd. De dieren worden 2x per dag geobserveerd zolang score 3 is gescoord. Dieren, die voortijdig worden geëuthanaseerd/dood gaan, worden ook nog gewogen.
- D21: Einde proef: alle muizen worden geëuthanaseerd.

#### Opmerking 1:

De i.v. toediening van antilichaam, welke 100% bescherming biedt tegen ziekte en sterfte, is bedoeld als modelcontrole en gouden standaard voor bescherming (en de brug naar voorgaande experimenten). De PBS (de negatieve controle) en de i.v. toediening van antilichaam (de positieve controle) geven samen overzicht over het referentiekader van 0% tot 100% bescherming tegen lethale challenge met influenza virus. Zo wordt het gebruikte modelsysteem gecontroleerd op een correcte werking.

#### Opmerking 2:

De toegediende influenzastam varieert, afhankelijk van het te testen vaccin en het stadium van onderzoek. In eerste instantie wordt het vaccin getest met een homologe challenge: de influenzastam is van hetzelfde type als het vaccin. Om te onderzoeken of het vaccin ook kruisbescherming levert, worden de muizen gechallenged met een heterologe virusstam, die een andere typering heeft dan het vaccivirus. Op dit moment zijn er modellen voor verschillende influenzatypen beschikbaar, waaronder varianten van .

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

De benodigde groepsgrootte wordt bepaald op basis van de resultaten van voorgaande experimenten, waarbij rekening wordt gehouden met de te verwachten bescherming van het vaccin en de uniformiteit van de respons van de muizen op de challenge infectie. Voorafgaand aan elk experiment wordt eerst een statistische analyse gemaakt om de gewenste groepsgrootte te bepalen. Indien mogelijk worden experimenten zodanig ingericht dat meerdere

doelstellingen in 1 experiment bekeken worden, zodat op controle groepen bespaard kan worden. Bijvoorbeeld experiment type 1 (vaccinatie/challenge) wordt wanneer mogelijk gecombineerd met experiment typen 5 of 6 (respectievelijk aandeel antilichaam en cellulaire component). De negatieve (onbehandelde) en positieve (antilichaam behandelde) controle groepen kunnen dan worden gebruikt in de analyse van beide experimenten. Zo kan het totale aantal gebruikte dieren binnen het project worden verminderd.

## B. De dieren

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

Diersoort: Muis (*Mus musculus*), vrouwelijke dieren, SPF, zoals in alle voorgaande experimenten.

Herkomst: van geregistreerd fok/toeleveringsbedrijf.

Geschatte aantallen: aantal dieren per experiment kan variëren van 15 tot 200 dieren; geschat op basis van de afgelopen jaren: gemiddeld 4 studies per jaar met gemiddeld 60 dieren per experiment: 240 dieren/jaar.

Levensstadia: muizen van ca. 6 weken oud. In sommige gevallen zullen oudere muizen (12+ weken) worden gebruikt om leeftijdseffecten uit te sluiten/te controleren.

## 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.

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.

Dieren in de negatieve controle groep overleven de influenza infectie niet. Het klinische scoringssysteem met daarin het gedefinieerde humane eindpunt moet bijdragen aan het verkorten van het lijden van de dieren. Dieren in een vroeger stadium euthanaseren zal de resolutie van de experimenten enorm doen afnemen. Het komt namelijk veelvuldig voor dat dieren met een klinische score 3 weer herstellen en score 1 of 0 halen. De conclusie van de meta-analyse is dat een groot deel van de in het verleden behaalde nuttige resultaten bij gewijzigd scoresysteem niet bereikt had kunnen worden. Daarmee waren de aanwijzingen die hebben geleid tot vaccinverbetering ook onopgemerkt gebleven.

## 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 door in vitro methoden is met de huidige stand van de wetenschap niet mogelijk, omdat de reactie van een levend wezen en in het bijzonder van het afweersysteem (immuunsysteem) op een vaccin of virus niet gesimuleerd kan worden.

Vermindering: De benodigde groepsgrootte wordt bepaald op basis van de resultaten van voorgaande experimenten, waarbij rekening wordt gehouden met de verwachte bescherming van het vaccin en de uniformiteit van de respons van de muizen op de challenge infectie. Indien mogelijk worden experimenten

zodanig opgezet dat meerdere vragen in 1 experiment kunnen worden beantwoord, zodat op controlegroepen bespaard kan worden. Bijvoorbeeld: experiment type 1 (vaccinatie/challenge) wordt gecombineerd met type 6 (aandeel cellulaire component). De negatieve (onbehandelde) en positieve (antilichaam behandelde) controlegroepen kunnen dan worden gebruikt in de analyse van beide experimenten. Zo is het mogelijk om het totale aantal gebruikte dieren binnen het project te verminderen.

Verfijning: De data gegenereerd in de experimenten worden uitvoerig statistisch geanalyseerd. Er worden voortdurend interstudie-analyses en trendanalyses over de verschillende experimentreeksen uitgevoerd ter vergroting van het inzicht in de muismodellen (voorbeelden daarvan zijn eerder besproken met de DEC). De uitkomsten van deze analyses spelen een belangrijke rol bij het ontwerp van vervollexperimenten.

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.

- De muizen krijgen ca. 1 week de tijd om te acclimatiseren.
- De muizen worden onder narcose gebracht voor toediening van virus en voor bloedafname.
- Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een score systeem (zie onder A), waarbij 3 = ruwe vacht (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen en 4 = ruwe vacht (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.
- Er worden geen nadelige milieueffecten verwacht, de dieren worden gehouden in gespecialiseerde dierfaciliteit met BSL2/BSL3 inperkingsniveau.

## 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.

De vaccins die worden getest zijn over het algemeen bedacht, geproduceerd en gepatenteerd door de opdrachtgever/onderzoekspartner. Deze vaccins zijn ook niet in het bezit van anderen. Daarmee is het vrijwel uitgesloten dat andere partijen precies dezelfde experimenten hebben uitgevoerd. Het komt wel voor dat een bestaand vaccin wordt meegenomen in het experiment ter vergelijking met de nieuwe kandidaatvaccins. Daarnaast volgen de onderzoekers die bij dit project betrokken zijn de wetenschappelijke literatuur.

## 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.

Er worden geen pijnstillers toegepast, omdat dit de resultaten van de proef zal beïnvloeden t.a.v. gedrag (sedatief) en/of klinisch-pathologische verschijnselen (ontstekingsremmend). De onderzoekers willen weten of, wanneer en hoe ziek gevaccineerde en ongevaccineerde muizen met en zonder T cel depletie worden na virus challenge.

☐ Ja

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De muizen kunnen ziek worden, met algehele malaise (bol zitten), verminderde eetlust, ademhalingsproblemen en in het ernstigste geval sterfte.

Verder ondervinden ze ongerief van een aantal experimentele handelingen:

- Bloedafnames, d.m.v. wangprik; 2x 100-150 µl per keer
- Experimentele vaccinatie groepen (inclusief negatieve (PBS) controle): i.m. injectie 50 µl in de achterpoot beiderzijds
- Toediening van cel-depleterende antilichamen: max. 4x, 500 µl i.p.
- Antilichaam (CR6261 of CR8020 behandeling controlegroepen: 1x 200 µl i.v.
- Alle groepen: intranasale infectie met influenza virus onder narcose

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De muizen ontwikkelen een pneumonie t.g.v. de influenza virus infectie. Experimentele handelingen zijn noodzakelijk voor toediening van virus/vaccin/antilichaam en afname van bloedmonsters.

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

- De dieren worden onder narcose gebracht voor intranasale toediening van het virus.
- Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een score systeem (zie onder A). Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.

#### **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.

Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een score systeem (zie onder A), waarbij 3 = ruwe vacht (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen en 4 = ruwe vacht (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd (=HEP).

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

In de ongevaccineerde negatieve modelcontrole groep (PBS): 80-100% en in de gevaccineerde groepen: gemiddeld 50%. Er zijn soms vaccins die minder werken dan verwacht, dan reageren de dieren in het ergste geval bijna gelijk aan ongevaccineerde dieren. Er zijn ook vaccins die perfect beschermen, waardoor de dieren helemaal geen ongerief ondervinden van de influenza infectie. De antilichaam behandelde modelcontrole dieren: 0% kans: het antilichaam geeft volledige bescherming.

#### **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 ongevaccineerde controle dieren ondervinden de nadeligste effecten van de influenza infectie: ernstig;

Gevaccineerde dieren tonen meer variatie, maar over het algemeen worden de dieren op zijn minst deels beschermd: matig, maar bij uitblijven van bescherming door vaccinatie kan het ernstig zijn; antilichaam-behandelde controlegroep: matig. Cumulatief ongerief: schatting tussen 5-25% (afhankelijk van grootte van het experiment, grootte van negatieve controlegroep, effectiviteit van de geteste vaccins) ernstig ongerief, overige dieren: matig ongerief.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Deel van de dieren zal waarschijnlijk sterven aan de gevolgen van de influenza infectie. Overlevende dieren worden aan het einde van de proef geëuthanaseerd, omdat door de blootstelling aan influenza virus de immuunstatus van deze dieren is veranderd en zij voor ander onderzoek binnen het project onbruikbaar geworden zijn. In sommige gevallen worden de dieren aan het eind van de proef gedood, waarna organen (b.v. milt, lymfeknopen, lever, hersenen) en/of bloed van de muizen worden verzameld voor nader onderzoek.

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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

| 1.1        | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.           | 40100                                                                                                                      |            |                |   |                              |
|------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|----------------|---|------------------------------|
| 1.2        | Vul de naam van de instelling of organisatie in. |                                                                                                                            |            |                |   |                              |
| 1.3        | Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | <table><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr><tr><td>7</td><td>Invloed bestaande immuniteit</td></tr></table> | Volgnummer | Type dierproef | 7 | Invloed bestaande immuniteit |
| Volgnummer | Type dierproef                                   |                                                                                                                            |            |                |   |                              |
| 7          | Invloed bestaande immuniteit                     |                                                                                                                            |            |                |   |                              |

*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 dit experiment wordt onderzocht wat de invloed is van bestaande immuniteit op de effectiviteit van het kandidaatvaccin. Daarvoor worden de muizen eerst "gepre-immuniseerd" en vervolgens gevaccineerd en gechallenged zoals beschreven in experiment type 1 (vaccinatie-challenge experiment). De respons van muizen met pre-immuniteit wordt vergeleken met die van muizen zonder pre-immuniteit.

Primaire uitkomstparameters: Lichaamsgewicht, overleving en klinische score.



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.

Layout van typisch bestaande immuniteit experiment

- ca. 1 week acclimatiseren
- Bloedafname van alle groepen een dag voor vaccinatie voor bepaling van de antilichaamtiter (preserum).
- Pre-immunisatie van alle groepen 1, 2 of 3x met 3 of 4 weken interval door vaccinatie met een conventioneel vaccin of door intranasale infectie met een lage dosis influenzavirus. De methode van immunisatie is afhankelijk van het virus waartegen pre-immuniteit moet worden opgewekt.
- Bloedafname van alle groepen voorafgaand aan elke vaccinatie voor bepaling van de antilichaamtiter.
- 4-6 weken na de laatste pre-immunisatie: vaccinatie van testgroepen met kandidaatvaccins 1, 2 of 3x met 3 of 4 weken interval.
- D-1: Bloedafname van alle groepen voor bepaling van de antilichaamtiter  
Toediening antilichaam i.v. aan positieve controlegroep en PBS aan negatieve controlegroep (zie opmerking 1).
- D= 0: Intranasale toediening van influenzavirus.
- D-1 t/m 21: De muizen worden dagelijks gewogen en klinisch beoordeeld. Voor de klinische beoordeling wordt het volgende score systeem gehanteerd:  
0 = normale muis; 1= ruwe vacht, maar net zo actief tijdens handelingen als normale muis; 2 = ruwe vacht (evt. bol/opgerold), minder actief tijdens handelingen; 3 = ruwe vacht (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen; 4 = ruwe vacht (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd. De dieren worden 2x per dag geobserveerd zolang score 3 is gescoord.
- D21: Einde proef: alle overlevende muizen worden geëuthanaseerd.

Opmerking 1:

De i.v. toediening van antilichaam, welke 100% bescherming biedt tegen ziekte en sterfte, is bedoeld als modelcontrole en gouden standaard voor bescherming (en de brug naar voorgaande experimenten). De PBS (de negatieve controle) en de i.v. toediening van antilichaam (de positieve controle) geven samen overzicht over het referentiekader van 0% tot 100% bescherming tegen lethale challenge met influenza virus. Zo wordt het gebruikte modelsysteem gecontroleerd op een correcte werking.

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

De benodigde groepsgrootte wordt bepaald op basis van de resultaten van voorgaande experimenten, waarbij rekening wordt gehouden met de te verwachten bescherming van het vaccin en de uniformiteit van de respons van de muizen op de challenge infectie. Voorafgaand aan elk experiment wordt eerst een statistische analyse gemaakt om de benodigde groepsgroottes te bepalen. Indien mogelijk worden experimenten zodanig opgezet dat meerdere doelstellingen in 1 experiment kunnen worden gecombineerd, zodat op controlegroepen wordt bespaard. Bijvoorbeeld: experiment type 1 (vaccinatie/challenge) wordt wanneer mogelijk gecombineerd met andere experiment types 5 of 6 (aandeel antilichaam of cellulaire component). De negatieve (onbehandelde) en positieve (antilichaam behandelde) controle groepen kunnen dan worden gebruikt in de analyse van beide experimenten. Zo kan het totale aantal gebruikte dieren binnen het project worden verminderd.

## B. De dieren

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

Diersoort: Muis (*Mus musculus*), vrouwelijke dieren, SPF, zoals in alle voorgaande experimenten.

Herkomst: van geregistreerd fok/toeleveringsbedrijf.

Geschatte aantallen: 2 à 3 experimenten tijdens complete looptijd van het project met maximaal 200 dieren per experiment: 200 dieren per jaar.

Levensstadia: muizen van ca. 6 weken leeftijd.

## 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.

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 welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging door *in vitro* methoden is met de huidige stand van de wetenschap niet mogelijk, omdat de reactie van een levend wezen met een al aanwezige immuniteit tegen influenza of delen daarvan op een vaccin en/of virus kan niet kan worden gesimuleerd.

Vermindering: Voordat vaccinkandidaten in dit type experiment getest worden, om te bepalen of bestaande immuniteit een complicatie zal zijn bij de toepassing van dat vaccin, zullen deze vaccins de leidende kandidaten zijn en waarschijnlijk geselecteerd zijn voor humane trials, na een gehele selectieproces binnen het project. Deze experimenten zullen hierdoor naar verwachting laag in frequentie zijn. Hiernaast wordt het aantal benodigde dieren in de experimenten uitvoerig statistisch doorgerekend, om enerzijds het aantal dieren te beperken, maar tegelijkertijd wel meer zekerheid te krijgen dat de gegevens die uit het experiment komen bruikbaar zijn om conclusies uit te trekken (en om zo te voorkomen dat experimenten herhaald moeten worden).

Verfijning: Het influenza muismodel is in de wetenschappelijke wereld geaccepteerd als geschikt model voor het testen van vaccin en medicijnen voor toepassing in de mens. Binnen het instituut wordt er al meer dan tien jaar intensief gewerkt met influenza muismodellen, waarvan er een groot aantal binnen het instituut ontwikkeld zijn, voor het doel om anti-influenza methodes te onderzoeken.

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.

- De muizen krijgen ca. 1 week de tijd om te acclimatiseren.
- De muizen worden onder narcose gebracht voor toediening van virus.
- Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een scoresysteem (zie onder A), waarbij 3 = ruwe vacht (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen en 4 = ruwe vacht (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.
- Er worden geen nadelige milieueffecten verwacht, de dieren worden gehouden in gespecialiseerde dierfaciliteit met BSL2/BSL3 inperkingsniveau.

## 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.

De vaccins die worden getest zijn over het algemeen bedacht, gepatenteerd en geproduceerd door de opdrachtgever. Deze vaccins zijn ook niet in het bezit van anderen. Daarmee is het vrijwel uitgesloten dat andere partijen precies dezelfde experimenten hebben uitgevoerd. De onderzoekers die bij dit project betrokken zijn volgen de wetenschappelijke literatuur.

## 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.

Er worden geen pijnstillers toegepast, omdat dit de resultaten van de proef zal beïnvloeden t.a.v. gedrag (sedatief) en/of klinisch-pathologische verschijnselen (ontstekingsremmend). De onderzoekers willen weten of, wanneer en hoe ziek gevaccineerde en ongevaccineerde muizen met en zonder pre-immuniteit worden na virus challenge.

☐ Ja

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De muizen kunnen ziek worden, met algehele malaise (bol zitten), verminderde eetlust, ademhalingsproblemen en in het ernstigste geval sterfte.

Verder ondervinden ze ongerief van een aantal experimentele handelingen:

- Bloedafnames, d.m.v. wangprik; 2x 100-150 µl per keer
- Pre-immunisatie: max. 3x (met 3 of 4 weken interval) i.m. injectie 50 µl in de achterpoot, beiderzijds
- Experimentele vaccinatie: max. 3x (met 3 of 4 weken interval) i.m. injectie 50 µl in de achterpoot, beiderzijds
- Controlegroepen: toediening antilichaam (CR6261 of CR8020) of PBS: 1x 200 µl i.v.
- Alle groepen: intranasale toediening (50 µl) influenza virus, onder narcose

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De muizen ontwikkelen een pneumonie t.g.v. de influenzavirus infectie. Experimentele handelingen zijn noodzakelijk voor toediening van virus/vaccin/antilichaam en afname van bloed.

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

- De dieren worden onder narcose gebracht voor intranasale toediening van het virus.
- Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een scoresysteem (zie onder A). Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.

## 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.

Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een score systeem (zie onder A), waarbij 3 = ruwe vacht (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen en 4 = ruwe vacht (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd (=HEP).

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

In de ongevaccineerde controle groep 80-100% en in de gevaccineerde groepen gemiddeld 50%. Er zijn soms vaccins die minder werken dan verwacht, dan reageren de dieren in het ergste geval bijna gelijk aan ongevaccineerde dieren. Er zijn ook vaccins die perfect beschermen, waardoor de dieren helemaal geen ongerief ondervinden van de influenza infectie. De antilichaam behandelde controle dieren: 0% kans, het antilichaam geeft volledige bescherming.

## 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 ongevaccineerde controle dieren ondervinden de nadeligste effecten van de influenza infectie: ernstig. Antilichaam behandelde controle groep: matig. Gevaccineerde dieren tonen meer variatie, maar over het algemeen worden de dieren op zijn minst deels beschermd: matig, bij uitblijven van bescherming door vaccinatie kan het oplopen tot ernstig. Cumulatief ongerief: ernstig.

## Einde experiment

## L. Wijze van doden

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

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Overlevende dieren worden aan het einde van de proef geëuthanaseerd, omdat door de blootstelling aan influenzavirus de immunestatus van deze dieren is veranderd en zij voor ander onderzoek onbruikbaar zijn geworden. In sommige gevallen worden de dieren aan het eind van de proef gedood, waarna organen (b.v. milt, lymfeknopen, lever, hersenen) en/of bloed van de muizen worden verzameld voor nader onderzoek.

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





## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting DLO  
t.a.v. [REDACTED]  
Akkermaai Bos 12  
6700 AW Wageningen  
Nederland

### Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

T 0900-2800028 (10 ct /min)  
Info@zbo-ccd.nl

Onze referentie  
Aanvraagnummer  
AVD40100201562  
Uw referentie

Bijlagen  
1

Datum 29 juni 2015  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 11 mei 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van Influenza (griep) vaccins" met aanvraagnummer AVD40100201562. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 20 mei 2015 en 08 juni 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft gereageerd op de vraag naar de motivatie voor het gebruik van uitsluitend vrouwelijke muizen en op de vraag over de primaire uitleesparameters en de humane eindpunten, resp. naar de motivatie voor het gebruik van uitsluitend vrouwelijke muizen en naar welk aantal dieren welk type ongerief zal ondergaan.

Op 20 mei 2015 heeft de DEC gereageerd op onze vragen.

### Beslissing

Wij keuren uw aanvraag gedeeltelijk goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

U kunt met uw project "Ontwikkeling van Influenza (griep) vaccins" starten. De vergunning wordt afgegeven van 29 juni 2015 tot en met 31 mei 2020.

### Beoordeling achteraf

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

### Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-DLO gevoegd d.d. 07 mei 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons ten dele vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie deels over: we menen dat de DEC voorbijgegaan is aan het ontbreken van een wetenschappelijke onderbouwing voor het gebruik van enkel vrouwelijke dieren. Het gebruik van dieren van één sekse leidt tot het verhogen van het aantal dieren dat in voorraad gedood wordt.

De Commissie volgt de aanvrager in diens zienswijze, verwoord in diens mail d.d. 08 juni 2015,

dat het niet waarschijnlijk is dat het geslacht van de mulzen van invloed is op de uiteindelijke conclusies ten aanzien van de potentiële werkzaamheid van de vaccins. Zij deelt de zienswijze van de aanvrager dat het nodig is om enkele dierproeven vooraf te valideren met mannelijke dieren, alsook bijkomende experimenten uit te voeren om te achterhalen of de resultaten met mannelijke dieren vergelijkbaar zijn met de (historische) resultaten met vrouwelijke dieren en of de variatie bij mannelijke dieren vergelijkbaar is met deze bij vrouwelijke dieren.

Daarom staat de Commissie toe dat voor de hierboven vermelde pilotstudy's dierproeven uitgevoerd worden en stelt nadere voorwaarden. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan 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 gegevens in het colofon.

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

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

#### **Meer informatie**

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

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163



**Bijlagen**

**- Vergunning**

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting DLO  
Adres: Akkermaalbos 12  
Postcode en woonplaats: 6700 AW Wageningen  
Deelnemersnummer: 40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 29 juni 2015 tot en met 31 mei 2020, voor het project "Ontwikkeling van Influenza (griep) vaccins" met aanvraagnummer AVD40100201562, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-DLO. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies omdat de DEC voorbijgegaan is aan het ontbreken van een wetenschappelijke onderbouwing voor het gebruik van enkel vrouwelijke dieren. Het gebruik van dieren van één sekse leidt tot het verhogen van het aantal dieren dat in voorraad gedood wordt.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is wetenschappelijk medewerker.

De aanvraag omvat de volgende beschelden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 11 mei 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen op 11 mei 2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 11 mei 2015;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 11 mei 2015.

### Dierproeven

| Naam dierproef                     | Diersoort           | Aantal dieren | Ernst                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Voorwaarden |
|------------------------------------|---------------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 1. Vaccinatie/Challenge experiment | Muis (Mus musculus) | 12000         | 5-25% ernstig;<br>75-95% matig                                                                                                                                                                                                                                                              | Zie verder. |
| 2. Virusadaptatie in muis          | Muis (Mus musculus) | 225           | ernstig                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Zie verder. |
| 3. Bepaling van infectiedosis      | Muis (Mus musculus) | 300           | Groep 1: 100% ernstig ongerief;<br><br>Groep 2: 80-90% ernstig ongerief/10-20% matig ongerief;<br><br>Groep 3: 60-70% ernstig ongerief/30-40% matig ongerief;<br><br>Groep 4: 30-50% ernstig ongerief/50-70% matig ongerief;<br><br>Groep 5: 10-30% ernstig ongerief/70-90% matig ongerief. | Zie verder. |
| 4. Bepaling van dynamische bereik  | Muis (Mus)          | 200           | 50% matig                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Zie verder. |

**Datum**  
25 juni 2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
40100201562

| <b>Influenzamodel</b>                   | <b>musculus)</b>           |             | <b>50% ernstig</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                    |
|-----------------------------------------|----------------------------|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| <b>5. Aandeel antilichaam component</b> | <b>Muis (Mus musculus)</b> | <b>1250</b> | <p>Deel I: 100% van de dieren maximaal cumulatief ongerief: matig.</p> <p>Deel II: Antilichaamcontrole groep (ca. 20% van dieren in proef): maximaal cumulatief ongerief: matig</p> <p>Negatieve (onbehandelde) controlegroep (ca. 20% van dieren in proef): maximaal cumulatief ongerief: ernstig</p> <p>Overige groepen van de dieren die behandeld worden met antiserum (ca. 60% van dieren): maximaal cumulatief ongerief: matig.</p> | <b>Zie verder.</b> |
| <b>6. Aandeel cellulaire component</b>  | <b>Muis (Mus musculus)</b> | <b>1200</b> | 5-25% ernstig;<br>75-95% matig                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>Zie verder.</b> |
| <b>7. Invloed bestaande immuniteit</b>  | <b>Muis (Mus musculus)</b> | <b>1000</b> | <p>Negatieve (ongevaccineerde) controle (20% van dieren in proef): maximaal cumulatief ongerief: ernstig;</p> <p>Positieve (antilichaam behandelde) controle (20% van dieren in proef): maximaal cumulatief ongerief: matig;</p> <p>Experimentele gevaccineerde groepen (60% van de dieren in proef): maximaal cumulatief: matig.</p>                                                                                                     | <b>Zie verder.</b> |

Beoordeling achteraf zal uiterlijk op 31 augustus 2020 plaatsvinden.

**Datum**

25 juni 2015

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

40100201562

**Voorwaarden**

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

De vergunning wordt verleend onder de volgende voorwaarden:

- dat de groepsgrootte voor de dierproeven en de mogelijke herhaling van reeds elders uitgevoerd onderzoek uit deelproject C worden afgestemd met de IvD.
- dat voor alle dierproeven mannelijke en vrouwelijke dieren in evenredige aantallen worden gebruikt. Zo doende wordt voorkomen dat surplusdieren van het mannelijke geslacht moeten gedood worden in voorraad.
- dat de aanvrager de uitkomsten van de pilotonderzoeken aan de CCD rapporteert alvorens de andere dierproeven te starten. De uitkomst van de pilotonderzoeken kan voor de Commissie aanleiding geven om bovenstaande voorwaarde (om voor alle dierproeven mannelijke en vrouwelijke dieren in evenredige aantallen te gebruiken) bij deze projectvergunning te handhaven, dan wel te wijzigen of in te trekken.

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

In artikel 13d 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.

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

Deze beoordeling zal uiterlijk 31 augustus 2020 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 lijden van de proevendieren conform de vergunning waren.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stg DLO



Postbus 59  
6700 AW WAGENINGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)  
0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD40100201562

**Bijlagen**

2

Datum 12-05-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw



Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 11 mei 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD40100201562. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling 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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



### **Gegevens aanvrager**

#### Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 40100  
Naam instelling of organisatie: Stg DLO  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 9098104  
Straat en huisnummer: Akkermaalsbos 12  
Postbus: 59  
Postcode en plaats: 6700 AW WAGENINGEN  
IBAN: NL10RABO0397066465  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Wageningen UR

#### Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: Wetenschappelijk medewerker  
Afdeling: CVI  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]@wur.nl

**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 juni 2015  
Geplande einddatum: 1 juni 2020  
Titel project: Ontwikkeling van influenza (griep) vaccins  
Titel niet-technische samenvatting: Ontwikkeling van influenza (griep) vaccins  
Naam DEC: DEC-DLO  
Postadres DEC: Postbus 65, 8200 AB Lelystad  
E-mailadres DEC: [REDACTED]@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  
Overige bijlagen: ☒ DEC-advies

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: gemandateerd vergunninghouder  
Plaats: Wageningen  
Datum: 11 mei 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stg DLO



Postbus 59

6700 AW WAGENINGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD40100201562

**Bijlagen**

2

Datum 12-05-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 12 mei 2015

Vervaldatum: 11 juni 2015

Factuurnummer: 20157062

| Omschrijving                                                                    | Bedrag   |
|---------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Betaling leges projectvegrunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD40100201562 | € 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.