

	Inventaris Wob-verzoek W16-16S								
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2016460								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x	x		x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x	x		x	
5	Poweranalyse				x	x	x	x	
6	DEC-advies				x	x		x	
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Advies CCD		x						x
9	Beschikking en vergunning				x		x	x	



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☐ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10800 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
		KvK-nummer	30275924
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	[Redacted]
		Postbus	12007
		Postcode en plaats	[Redacted]
		IBAN	[Redacted]
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] ✓ Dhr. Mw.
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] Dhr. ✓ Mw.
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]

1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.	(Titel) Naam en voorletters		Dhr.	Mw.
	Functie			
	Afdeling			
	Telefoonnummer			
	E-mailadres			
1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	Ja	> Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> 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
2.2 Is dit een <i>wijziging</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?	☐ 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
	Ja	> Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
2.3 Is dit een <i>melding</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?	Nee	> Ga verder met vraag 3
	Ja	> Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	01 - 4 - 2016
	Einddatum	01 - 4 - 2021
3.2 Wat is de titel van het project?	Study of dietary intervention with human milk oligosaccharides in order to improve immunity	
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Effect van voeding op de ontwikkeling van een gezond afweersysteem	
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC Utrecht
	Postadres	Huispostnummer D01.343, Postbus 85500, 3508 GA Utrecht
	E-mailadres	dec-utrecht@umcutrecht.nl

4 Betaalgegevens

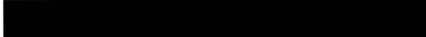
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935,= Lege
☐ Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
☐ Via een eenmalige incasso
☐ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- ☒ Projectvoorstel
- ☒ Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- ☐ Melding Machtiging
- ☒ Appendix 1

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 

Functie 

Plaats Utrecht

Datum 7 - 03 - 2015

Handtekening 



Form

Project proposal

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

1 General information

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

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- ☒ Basic research
- ☒ Translational or applied research
- ☐ Regulatory use or routine production
- ☐ Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare
- ☐ Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- ☐ Higher education or training
- ☐ Forensic enquiries

☐ Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Both UNICEF and the World Health Organisation (WHO) recommend exclusive breastfeeding up to the age of 6 months, with continued breastfeeding along with appropriate complementary foods up to the age of two years or even beyond. Numerous positive health benefits are associated with breast-feeding including reduced risk for infections. Human milk is therefore not only a comprehensive source of nutrition, it is also a well-established immune-factor helping immune defence against many different infections and diseases (*Ajetunmbi 2015*). Several studies have already shown that nutritional interventions, can enhance immune functions of infants and adults through boosting specific immune responses (*Schley 2002, Link-Amster 1994, de Vrese 2005, Haschke 2001*).

Moreover, previous studies using this vaccination model focused on the oligosaccharides derived from sources other than human milk and have shown translational capacity to humans (*Arslanoglu S, 2008*) in terms of immune modulation.

1.

2.

Within this research project we will study the immunological importance of unique and specific human milk components (HMOS) regarding their role in immune development.

HMOS are a family of structurally diverse unconjugated glycans that are highly abundant in and unique to human milk. The composition of human milk varies in time during feeding (*Bode L. 2012; Newburg DS, 2014*). We would like to understand the consequences hereof in terms of immune development, in order to support development of new immune modulating nutritional products (like infant formula).

Previous studies using chemical analogues of HMOS (combinations of a 9:1 mixture of galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides (scGOS/lcFOS)) have shown to be immune modulatory in a murine vaccination model (*Vos 2007*). Vaccine specific Delayed type hypersensitivity (DTH) as parameter for cellular T-helper 1 (Th1) dependent immunity was significantly increased in mice receiving scGOS/lcFOS containing diet as compared to mice receiving control diet. Moreover, in clinical studies, the same oligosaccharides have proven to be beneficial in terms of reducing infections and allergies when added to infant formula (*Arslanoglu 2007*).

Moreover, the use of vaccination response parameters such as DTH responses for studying immunomodulation in nutritional intervention studies was advocated by an ILSI/WHO expert group.

3.2 Purpose

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

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

New technologies have made new HMOS specific structures available for use in nutritional products. Within this research project we will study the immunological importance of these HMOS regarding their role in immune development.

We would like to understand the effect of these HMOS on immune development, in order to eventually support the development of new immune modulating nutritional products (like infant formula). We regard the objective as achievable because: 1. Within our department, techniques for vaccinating mice have been well established (Vos et al 2006; Vos et al 2007 etc), as well as the proposed parameters based on our experience 2. Our hypothesis (objective) is theoretically possible according to the literature and based on our current knowledge about human milk oligosaccharides.

Therefore during the project,

Research question 1

Research question 2

Research Question 3

Research question 4

Research question 5

3.3 Relevance

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

Both UNICEF and the World Health Organisation (WHO) still recommend exclusive breastfeeding up to the age of 6 months, with continued breastfeeding along with appropriate complementary foods up to the age of two years or even beyond. Numerous positive health benefits are associated with breast-feeding including reduced risk for infections, reduced development of autoimmunity like type 1 diabetes and reduced onset of allergies. Human milk is therefore not only a comprehensive source of nutrition, it is also a well-established immune-factor helping immune defence against many different infections and diseases (Ajetunmobi 2015). Nevertheless, it is less known what the individual contribution of breast milk specific components is to the development of the immune system, therefore, even modern infant formula lack especially components (HMOS), which are tailor-made by each mum in time for the immune development of her baby.

Thus, it may contribute to human health, specifically the infant's developing immune system. In addition, obtained knowledge may in the future also be used to support people with failing or reduced immune capacity.

3.4 Research strategy

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

Research Strategy:

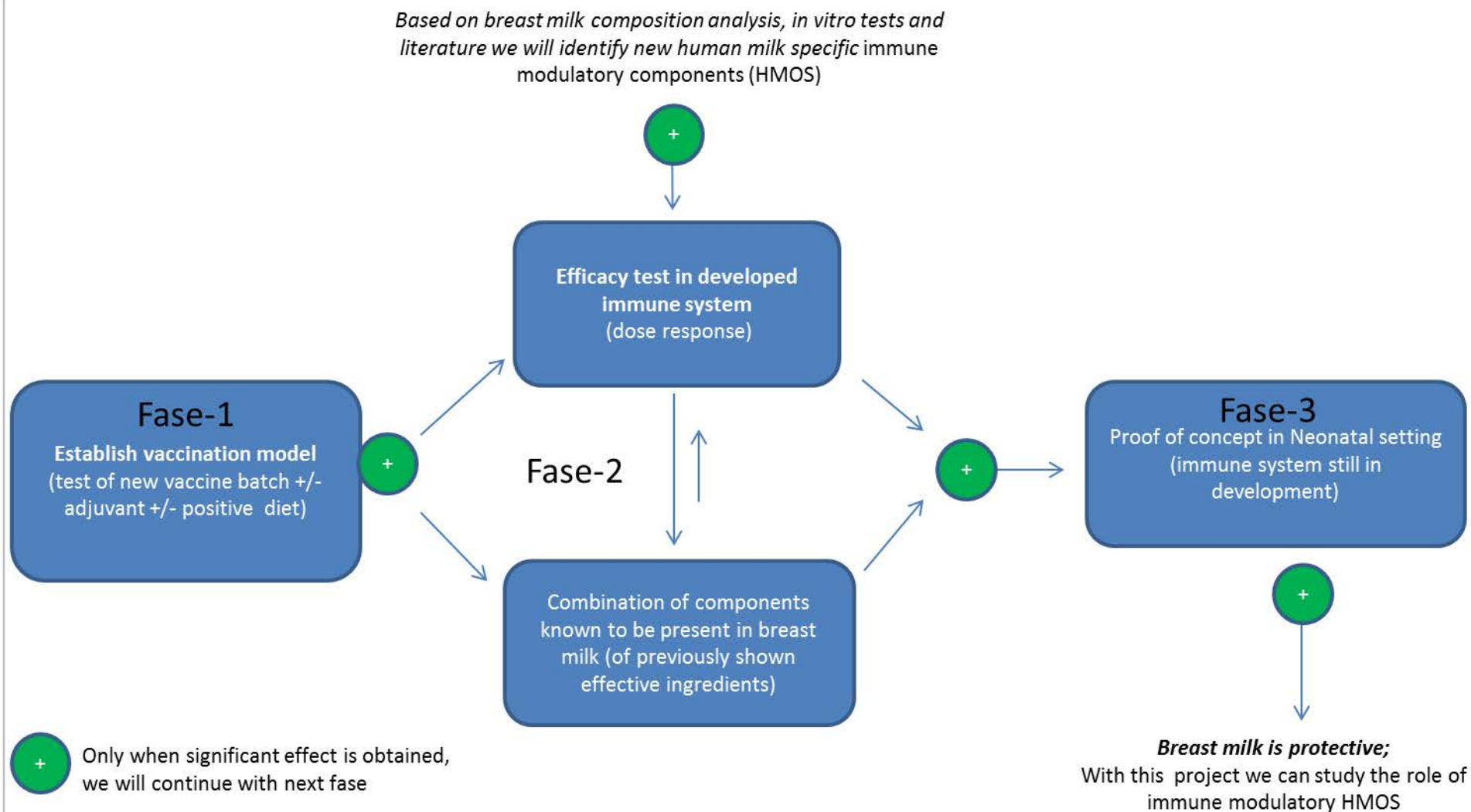


Figure 1. Our research strategy as depicted in this figure, is based on first the identification of new human milk specific immune modulatory components (HMOS), prior to testing them in the selected in vivo model. The in vivo testing will be done within three fases as indicated. Fase 1 is the model evaluation (RQ1), Fase 2 is the fase in which we will address RQ 2-4, and in Fase 3 we will address RQ 5, as described in detail below.

+ Is indicative for a discision point: Only when significant effect is obtained, we will continue with next fase.

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

Fase 1 => research question 1 (RQ1):

[REDACTED] As the commercially available vaccine is changing in composition each year, we will need to establish not only the vaccine efficiency of this new vaccine, but also proof that we can detect the dietary immune modulation in terms of increased DTH as previously shown (Vos et al 2007) when using the new vaccine. Previous studies using this vaccination model focused on the oligosaccharides derived from sources other than human milk and have shown translational capacity to humans (Arslanoglu S, 2008) in terms of immune modulation. Therefore we want to be sure that also using the new vaccine we can detect known immune modulation capacity of the diet. i.e. RQ1 is therefore not only to study the DTH-response induced by the new vaccine [REDACTED]

Fase 2 => research question RQ2, 3 and 4:

[REDACTED]
[REDACTED]
Previous studies using this vaccination model focused on the oligosaccharides derived from sources other than human milk and have shown translational capacity to humans (Arslanoglu S, 2008) in terms of immune modulation. Therefore we use the same model, but current study focuses on HMOS (RQ2) we will test these HMOS in order to identify optimal concentration of the single ingredient. Based on breast milk composition analysis, in vitro tests and literature we have now identified 3 new HMOS which we want to test within this model.

Fase 3 => research question 5:

[REDACTED] As neonatal mice have an immune system which is still in development it will be difficult to identify immune modulating HMOS on top of these developmental changes, therefore at a later stage within the research project we will test one of the optimal HMOS (or combination hereof) [REDACTED] The measurable effects from maternal consumption on pups have been demonstrated by several studies (Hogenkamp, 2015; Reiko, 2010).

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

Only when a significant effect is obtained in **Fase 1** we will continue with **Fase 2** of the project, and when optimal combination / concentration of immune modulatory HMOS is established we will continue with **Fase 3** of the project. Individual experiments within each Fase are explained in detail within the appendix and depicted within table below.

Establish vaccination model (fase 1) Experiment (n)	Efficacy test in developed immune system (fase 2) Experiment (n)	Proof of concept in Neonatal setting (fase 3) Experiment (n = pups + moms)
Exp 1a without adjuvant (75)	Exp 2 HMOS1 (57)	Exp 11a without adjuvant(75+30)
Exp 1b with adjuvant (75)	Exp 3 HMOS2 (57)	Exp 11b with adjuvant (75+30)
	Exp 4 HMOS1+2 (75)	Exp 12 HMOS 1/2/3 (48+20+27(milking moms))
	Exp 5 HMOS3 (57)	Exp 13 HMOS 1+2+3 (57+24)
	Exp6 HMOS1+3 (75)	
	Exp7 HMOS2+3 (75)	
	Exp8 HMOS1+2+3 (198)	
	Exp 9 Timing HMOS 1/2/3 (66)	
	Exp 10 Timing HMOS 1+2+3 (66)	
Total nr of mice (150)	Total nr of mice (726)	Total nr of pups (255) Total nr of breeders((Dams 104) + (Milking moms 27))

The choice of HMOS as well as the combinations of HMOS is based on our previous studies, as well as newly available information regarding breast milk composition changes.

In short:

Fase 1- Experiment 1a/b. A pilot study will be carried out in order to determine the efficacy of a new vaccine batch. A vaccine titration experiment (+/- adjuvant) will indicate the dose to induce the maximal DTH difference between diets. The mice will receive either control diet (AIN93G diet) or a positive control diet (diet including prebiotic oligosaccharides with known immune modulatory capacity like scGOS/lcFOS (Vos et al 2007))

Fase2-

It is known that breast milk composition changes over time,

Fase 3:

For this fase, we will set up breeding pairs (2 Dams with one male mice (male mice are not included in experiment / protocol) as we expect 50% pregnancy rate). Per Dam we expect an average of 5 pups (3-7 pups per nest), meaning that for an experiment with 75 mice we will start with 15 breeding pairs, = 30 mice (female). The surplus pups will be kept until 6 weeks of age, then their bone marrow cells and spleen cells will be used to conduct ex vivo experimentation supporting the generation of knowledge regarding the immune modulation of HMOS.

Fase	Animals (n)	
Fase 1	150	
Fase 2	726	
Fase 3	386	255 pups
		104 female breeders
		27 milking moms
Extra (male for breeding)	57	
Total	1319 incl 5% non-responders.	

Schematic graph and all experimental details are included within the appendix: 'Study of dietary intervention in a vaccination model in mice'

References:

@ Ajetunmobi OM, Whyte B, Chalmers J, Tappin DM, Wolfson L, Fleming M, et al. Breastfeeding is associated with reduced childhood hospitalization: evidence from a Scottish Birth Cohort (1997-2009). J Pediatr. 2015;166(3):620-5 e4

@ Schley P D, Field C J. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics [J]. British Journal of Nutrition, 2002, 87(S2): S221-S230.

@ Link-Amster H, Rochat F, Saudan K Y, et al. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake [J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 1994, 10(1): 55-63.

@ de Vrese M, Rautenberg P, Laue C, et al. Probiotic bacteria stimulate virus-specific neutralizing antibodies following a booster polio vaccination [J].

European journal of nutrition, 2005, 44(7): 406-413.

@ Haschke F, Firmansyah A, Meng M, et al. Functional food for infants and children [J]. Monatsschrift Kinderheilkunde, 2001, 149(1): S66-S70.

@ Ling X, et al. Modulation and programming of immunity and intestinal microbiota through early life supplementation with human milk oligosaccharides in an autoimmune mouse model. Unpublished.

@ Bode L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. Glycobiology. 2012;22(9):1147-62.

@ Newburg DS, Grave G. Recent advances in human milk glycobiology. Pediatr Res. 2014;75(5):675-9.

@ Vos A P, Haarman M, Van Ginkel J W H, et al. Dietary supplementation of neutral and acidic oligosaccharides enhances Th1-dependent vaccination responses in mice [J]. Pediatric allergy and immunology, 2007, 18(4): 304-312.

@ Vos A P, Knol J, Stahl B, et al. Specific prebiotic oligosaccharides modulate the early phase of a murine vaccination response. International immunopharmacology, 2010 10: 619-625.

@ Arslanoglu S, Moro GE, Boehm G. Early supplementation of prebiotic oligosaccharides protects formula-fed infants against infections during the first 6 months of life. J Nutr. 2007;137(11):2420-4.

@ Meijer K, de Vos P, Priebe M G. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health? [J]. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 2010, 13(6): 715-721.

@ Arslanoglu S, Moro G E, Schmitt J, et al. Early dietary intervention with a mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of allergic manifestations and infections during the first two years of life [J]. The Journal of nutrition, 2008, 138(6): 1091-1095.

@ Fujiwara R, Takemura N, Watanabe J, et al. Maternal consumption of fructo-oligosaccharide diminishes the severity of skin inflammation in offspring of NC/Nga mice [J]. British journal of nutrition, 2010, 103(04): 530-538.

@ Hogenkamp A, Thijssen S, van Vlies N, et al. Supplementing pregnant mice with a specific mixture of nondigestible oligosaccharides reduces symptoms of allergic asthma in male offspring [J]. The Journal of nutrition, 2015, 145(3): 640-646.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Study of dietary intervention in [REDACTED] model in mice
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10800	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	University of Utrecht	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		1	

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

It is well known that breast milk is protective against infections and contains immune modulating components.



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

- Shaving (small marker spots) of animals at arrival (shaving will be repeated in time when needed);
- Weekly weighing of the animals until the end of the experiment;
- Five times faecal sample collection (At arrival, before start intervention, end of intervention, before last vaccination, end of experiment);
- Start of the intervention (i.e. change of diets either with or without test ingredients see experimental set-up) starting 2 weeks prior to the immunisation (unless otherwise mentioned per experiment);
- [REDACTED]
- 24h later measuring ear thickness under isoflurane anaesthesia;
- Terminal bleeding under anaesthesia followed by cervical dislocation and collect organs/tissues/body fluids of interest for further analysis.

In addition, (when required to answer the research question) animals can be sacrificed at different time points during the protocol [REDACTED]. In addition, (when required to answer the research question) dietary interventions can be stopped and started at different time points during the protocol [REDACTED].

This project studying [REDACTED] in the developmental immune system i.e. in neonatal mice starting with the vaccination not before day 7 after birth (therefore see Breeding protocol below).

Breeding protocol: At arrival the mice ($\pm$ 9 weeks old, day 0) will be housed in groups. After 1.5 weeks acclimatizing the mating pairs (1 male with 2 females) are made and the breeding starts (day 12). The females are housed in pairs until they are clearly pregnant, then the females will be housed separately to prevent stress at the end of the pregnancy and with delivery of the pups (average of 5 pups per dam anticipated). The new born pups will be pooled and assigned to each nursing mother (5-10 pups/dam). Nests will be assigned randomly to control and experimental groups. [REDACTED]

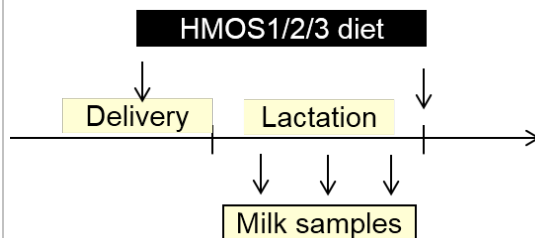


Figure 2. Scheme of testing milk samples at different time points during lactation. [REDACTED]

HMOS (dose1)	269	minimal relevant difference = 10%	9
HMOS (dose 2)	294	20%	9
HMOS (dose 3)	329	35%	9
HMOS (dose 4)	302	25%	9
SD within groups	45.6		
Effect size	0.643		
alpha	0.05		
power	0.90		

We estimated the increased DTH responses on base of previous work in our group (article: International Immunopharmacology 6 (2006) 1277–1286: A specific prebiotic oligosaccharide mixture stimulates delayed-type hypersensitivity in a murine influenza vaccination model by Arjan P. Vos et al.).

Out-come of G*Power program:

[1] -- Thursday, January 28, 2016 -- 07:49:48

F tests - ANOVA: Fixed effects, omnibus, one-way

Analysis: A priori: Compute required sample size

Input: Effect size f = 0.6428993

α err prob = 0.05

Power (1-β err prob) = 0.9

Number of groups = 5

Output: Noncentrality parameter λ = 18.5993779

Critical F = 2.6059749

Numerator df = 4

Denominator df = 40

Total sample size = 45

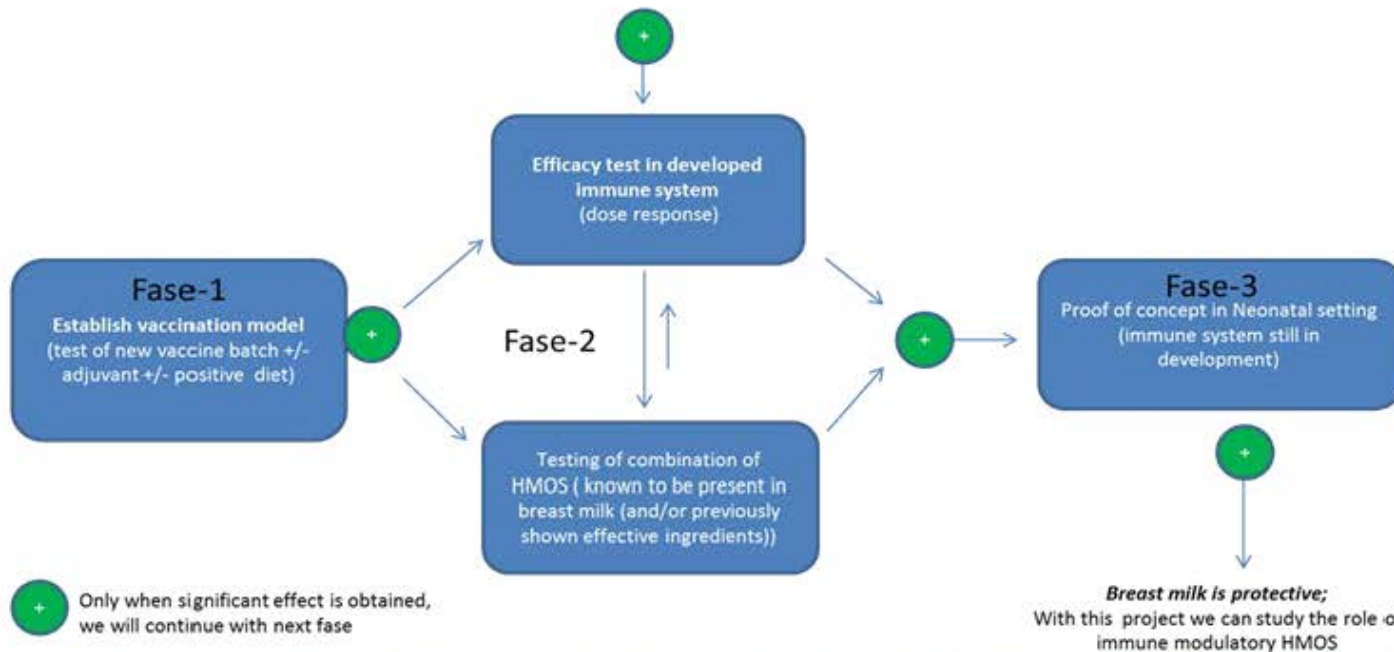
Actual power = 0.9211076

Conclusion:

In conclusion: regarding alpha error of 5% and a discernment of 90% there will be an effect of minimal 10% enhancement of the immune system in (diet-)supplemented groups when we will take 9 animals per group. On base of experience and literature, the negative control groups (sham) will be set on n=3 mice per group. Experiment 1a + 1b is a go or no-go experiment and we will establish first the immune effect of our positive control diet on the new batch with or without specol. Then, from experiment 2 - significant results of increased DTH responses between ingredient groups and control group will be tested. Because of the high variation, the number of 9 animals per experimental group is a temporary estimate and before the start of following experiments a recalculation is conducted in consultation with the Animal Welfare Body.

Experimental strategy

Based on breast milk composition analysis, in vitro tests and literature we will identify new human milk specific immune modulatory components (HMOS)



Establish vaccination model (fase 1) Experiment (n)	Efficacy test in developed immune system (fase 2) Experiment (n)	Proof of concept in Neonatal setting (fase 3) Experiment (n = pups + moms)
Exp 1a without adjuvant (75)	Exp 2 HMOS1 (57)	Exp 11a without adjuvant (75+30)
Exp 1b with adjuvant (75)	Exp 3 HMOS2 (57)	Exp 11b with adjuvant (75+30)
	Exp 4 HMOS1+2 (75)	Exp 12 HMOS 1/2/3 (48+20+27 (milking moms))
	Exp 5 HMOS3 (57)	Exp 13 HMOS 1+2+3 (57+24)
	Exp6 HMOS1+3 (75)	
	Exp7 HMOS2+3 (75)	
	Exp8 HMOS1+2+3 (198)	
	Exp 9 Timing HMOS 1/2/3 (66)	
	Exp 10 Timing HMOS 1+2+3 (66)	
Total nr of mice (150)	Total nr of mice (726)	Total nr of pup (255) Total nr of breeders ((Dams 104) + (Milking moms 27))

Fase 1:

Experiment 1.

[Redacted text block for Experiment 1]

Fase2:

[Redacted text block for Fase2]

Experiment 2.

[Redacted text block for Experiment 2]

Experiment 3.

[Redacted text block for Experiment 3]

Experiment 4.

[Redacted text block for Experiment 4]

Experiment 5.

[Redacted text block for Experiment 5]

Experiment 6.

[Redacted text block for Experiment 6]

Experiment 7.

[Redacted text block for Experiment 7]

Experiment 8

[Redacted text block for Experiment 8]

Experiment 9.

[Redacted text block for Experiment 9]

[REDACTED]

Experiment 10.

[REDACTED]

Fase 3:

[REDACTED]

Experiment 11.

[REDACTED]

Experiment 12.

[REDACTED]

Experiment 13.

Animal amount needed in each Fase has been summarized in the table below. Particularly, in Fase 3, female animals used for breeding are included while male animals are excluded in the calculation of the total experimental animals.

Fase	Animal number	
Fase 1	150	
Fase 2	726	
Fase 3	386	255 pups
		104 dams
		27 moms for milk
	57 (excluded from the total number)	57 males for mating
Total	1262	
Total	1319 taking 5% non responders into account	

In addition we think it is necessary to take [REDACTED] Non-responders' into account, since it is known that an estimated 5% of mice may not respond to vaccination. Therefore, extra mice will be required (total mice, $1262 + 1262 \times 5\% = 1319$ mice in total).

In total, we need 1319 mice +116 (breeders) = 1430 mice for this 5-year project.

B. The animals

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

1319 mice C57Bl/6J OlaHsd mice will be used in total (see the first table about how the number is built-up). Since the methods for establishment of vaccination model for this species are well established in both genders, we intend to use a total of 876 6-week-old mice and 255 neonatal mice (7-day-old) requiring 104 9-week-old female breeders (male mice for breeding are not included in this calculation) and 27 milking moms. And 57 extra mice are needed because 5% of the mice may be non-response [REDACTED]. In case a component or in vitro identified immune response is gender specific we will indicate this in the working protocol. In order to reduce the possible long co-housing stress of male mice we will co-house them in groups of max 5 mice per cage.

Fase	Animals (n)	
Fase 1	150	
Fase 2	726	
Fase 3	386	255 pups
		104 female breeders
		27 milking moms
Extra	57 males	
Total	1319	

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
C57Bl/6JOLAHsd mice	Harlan	1319	6-week-old 9-week old breeders 7 day old Neonatal mice

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☒ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: Unfortunately, replacement is not possible. Mammals (instead of less complex animals) are needed to allow translation to humans. The effect of the dietary intervention can't be examined other than in the intact laboratory animal. A good [REDACTED] response and the effects of breast milk specific components on immune response is the result of complex processes in the body, wherein the immune system and the intestinal tract play a major role. In this research the interaction between the intestinal tissue (direct contact with the food) and immune cells is essential, therefore the research can't be conducted in humans or only on cell systems or using mathematical computer models.

Reduction: A Negative control group is necessary to demonstrate the specificity of [REDACTED] induced responses; however these groups will never be used for statistical comparison to supplemented groups. Therefore in each experiment, we will use only 3 mice instead of 9 mice in each sham group, which will save 7 mice per experiment. Another important way to reduce animal use is to standardization of the experiment, due to our rich experience and knowledge for establishing the [REDACTED] model and accurately measuring the immune development, it allows to decrease the between-experiment variation of treatment effects and reduce the need repeatedly to perform the same experiments and will therefore contribute to a reduction of the use of animals. In addition, this

experiment has been divided into several sub-studies

Therefore sub-potent combinations will be skipped.

Refinement: DTH setting will be performed under isoflurane anaesthesia. Euthanasia (cervical dislocation) instead of injection of overdose pentobarbital will be performed after the experiment in order to avoid second injection on mice, which increases pain and stress to the animals.

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

No effect on weight is expected, Only if mice are losing weight (see rib bow) we will start to weigh mice more frequently (at least 1x per 2days). The body weight will be measured each week. All animals are killed by cervical dislocation under isoflurane anaesthesia at the end of the experiment or in case change in weight as >20% during the entire experiment. This is done in a quick and humane way, which limits the impact on animal welfare to a minimum.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question 1.

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

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

☒ Yes

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

no other adverse effects on the animals' welfare may be expected

Explain why these effects may emerge.

.

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

J. Humane endpoints

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

☒ No > Continue with question K.

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

General clinical signs are observed during the experiments (appearance, gait, mobility, fur condition, etc.) to assess the well being of the animals. When animal show signs of severe discomfort (not expected) and the change in weight as >20% during the entire experiment, animals are euthanized).

Indicate the likely incidence.

Likely incidence <2%.

K. Classification of severity of procedures

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

Mild – since these experiments require limited handling, two s.c. injections one i.d. injection under isoflurane anaesthesia and isoflurane anaesthesia at the end of the experiment. No weight loss or other discomfort is expected, therefore the experiments are regarded mild

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

All animals will be killed at the end of the experiment by cervical dislocation, before which Isoflurane anesthesia will be given to animals. A good response and the effects of breast milk specific components on immune response is a result of complex processes in the body, wherein the immune system and the intestinal tract play a major role. In this research the

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

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

☒ Yes

DEC number : 2015.II.243.038

Title project : Study of dietary intervention with human milk oligosaccharides in order to improve immune development.

Researchers : [REDACTED]

Faculty / Division/ Department : [REDACTED]

Animals used : mice, C57BL6/J

E-mail: [REDACTED]

Goal of the project :

The effective working of the immune system can be studied [REDACTED]
[REDACTED] The immune system is fully developed in adults but is still in development in infants. Numerous positive health benefits are associated with breast-feeding including reduced risk for infections, reduced development of autoimmunity like type-1-diabetes and reduced onset of allergies. Human milk is therefore not only a comprehensive source of nutrition, it is also a well-established immune-factor helping immune defence against many different infections and diseases. In this project the effects of nutritional intervention will be studied on the development and stimulation of a healthy immune system. The capability to give a good immune response [REDACTED]
[REDACTED] The project is divided in several sub-goals:

Within this research program we will study [REDACTED]
[REDACTED] HMOS are a family of structurally diverse unconjugated glycans that are highly abundant in and unique to human milk. The composition of human milk varies extensively between individuals and time of feeding). [REDACTED]
[REDACTED]

Therefore during the project, 5 main research questions will be addressed:

Research question 1: [REDACTED]
[REDACTED]

Research question 2: [REDACTED]
[REDACTED]

Research Question 3: [REDACTED]
[REDACTED]

Research question 4: [REDACTED]
[REDACTED]

Research question 5: [REDACTED]
[REDACTED]

protocol:

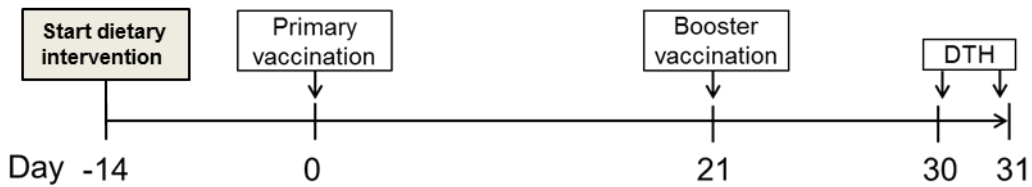


Figure 1.

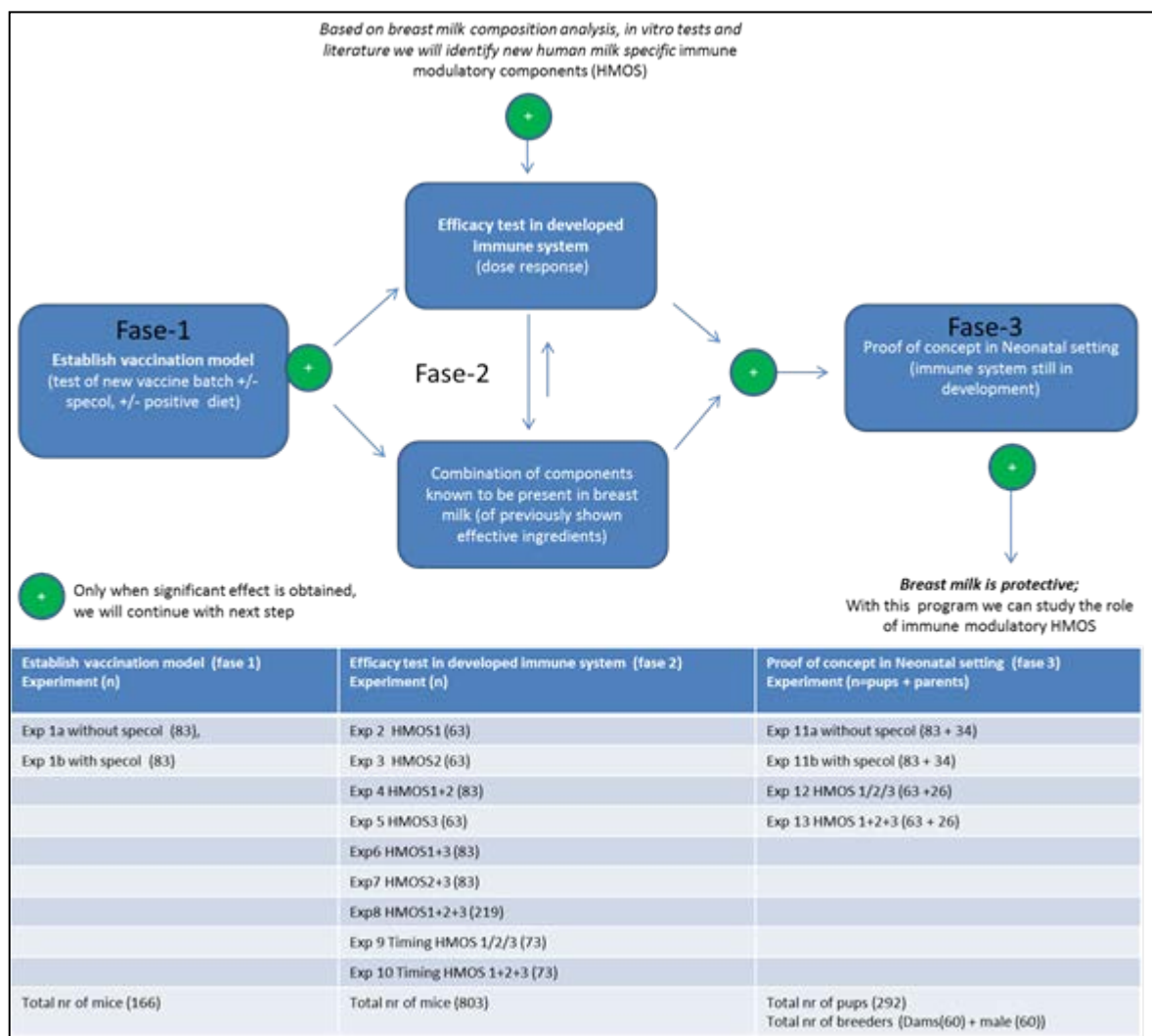
by two sub cutaneous (s.c.) injections with [REDACTED]. In the negative control group, the mice do not get any sub cutaneous injection. The study is build up in 3 phases (see schema below) and only whether significant effects will be obtained, next phase will be followed. That means for the setup that in the design of 13 experiments, groups will be repeated to get in the end reliable results. Therefore, the design of experiment 1 is taken as a model for the others and only the effect of the diet intervention on the [REDACTED] response has been taken in account in the calculations as a base for the following experiments.

Explanation and Calculation: For calculating the *sample size* we postulate our primary question:

[REDACTED]

To answer this question, an ANOVA statistical test suits the best to calculate the number of mice that are needed per experimental group to get a relevant difference in our treated groups. Therefore, the power analysis is based on several choices: $\alpha = 0.05$ and the power = $(1 - \beta) = 0.95$. These choices are based on:

- 1) In our research field it is usual that α is equal or less than 0.05 (Type I error as small as possible) and the power is high so that we may reject our null-hypothesis with a probability as big as possible that the control groups are equal to the experimental groups.
- 2) In this way we will generate reliable data with our valuable animals.
- 3) The reproducibility is strongly increased because of our experience gathered over a number of years with these kind of experiments, and therefore sigma (σ) can be kept as small as possible.
- 4) These statistical choices will lead to refinement of our experiments and numbers of animals needed for our experimental groups can be decreased, whereby we still can perform reliable experiments.
- 5) That means, on base of experience, for negative controls (sham groups; not taken in account in the statistical calculations) $n=3$ mice are sufficient to have a good basic for normal [REDACTED]
- 6) One way ANOVA is chosen in our model, based on previous work published in the International Immunopharmacology 6 (2006) 1277–1286: A specific prebiotic oligosaccharide mixture stimulates delayed-type hypersensitivity in a murine influenza vaccination model by Arjan P. Vos et al. Therefore, we like to follow the choice according to the article in which statistical differences between test and control groups will be analyzed by ANOVA and post hoc Dunnett's test if multiple groups are compared to a single (control) group. Bonferroni post hoc tests will be performed after ANOVA if comparisons are made to multiple groups. A significant result of increased DTH response between test and control group will be enough to go to the next phase. So, for experiment 1 a and b [REDACTED]



By use of the computer program “G*Power” we calculated the needed numbers of animals (n) per experimental group, depicted to be able to perform reliable statements and get biological relevant differences between DTH groups and experimental diet-treated groups regarding the several parameters that will be measured in these experiments.

(This calculation program has been downloaded via: <http://www.gpower.hhu.de> , Version 3.1.9.). The final number of 10 animals per experimental group as the come-out is a temporary estimate and before the start of the following experiments a recalculation is conducted (because of changed circumstances, variations are induced and can have influence on the numbers of animals needed per group) in consultation with the Animal Welfare Body.

In the program we filled in under sheet **Test Family: F tests**

Under sheet **Statistical Test: ANOVA: Fixed effects, omnibus, one way**

Under sheet **Type of power analysis:**

A priori: Compute required sample size – given α , power and effect size

The effect size in this case is the ratio of "minimum expected relevant difference between the 4 dose groups and the control DTH group" and "the standard deviation within a group".

	DTH ear (um))	(increased thickness	Relevant difference (=increased DTH)	Numbers (n)
Vaccination	243			10
HMOS (dose1)	269		minimal relevant difference = 10%	10
HMOS (dose 2)	294		20%	10
HMOS (dose 3)	329		35%	10
HMOS (dose 4)	302		25%	10
SDwithin groups	45.6			
Effect size	0.649			
alpha	0.05			
power	0.95			

We estimated the increased DTH responses on base of previous work in our group (article: International Immunopharmacology 6 (2006) 1277–1286: A specific prebiotic oligosaccharide mixture stimulates delayed-type hypersensitivity in a murine influenza vaccination model by Arjan P. Vos et al.). In this article it is published that the effect of dietary intervention causes a N-shaped effect, with 1 optimal dose, that will be the dose when the difference between the ear thickness of the test group and the control vaccination group is the highest. According to figure 2 in mentioned article and former data within our department group, differences will reach a maximum of 35% and will vary from 10 till 25% increased ear thickness compared to control DTH response. In this study we like to follow the line of calculations that statistical differences between test and control groups will be analyzed by ANOVA and post hoc Dunnett's test if multiple groups are compared to a single (control) group. Bonferroni post hoc tests will be performed after ANOVA if comparisons are made to multiple groups.

Out-come of G*Power program:

[1] -- Wednesday, November 18, 2015 -- 11:28:58

F tests – ANOVA: Fixed effects, omnibus, one-way

Analysis: A priori: Compute required sample size

Input: Effect size f = 0.6486188

α err prob = 0.05

Power (1- β err prob) = 0.95

Number of groups = 5

Output: Noncentrality parameter λ = 21.0353174

Critical F = 2.5787392

Numerator df = 4

Denominator df = 45

Total sample size = 50

Actual power = 0.9538260

Conclusion:

In conclusion: regarding alpha error of 5% and a discernment of 95% there will be an effect of minimal 10% enhancement of the immune system in (diet-)supplemented groups when we will take 10 animals per group. On base of experience and literature, the negative control groups (sham) will be set on n=3 mice per group.

Experiment 1a + 1b is a go or no-go experiment and

Because of the high variation, the number of 10 animals per experimental group is a temporary estimate and before the start of following experiments a recalculation is conducted in consultation with the Animal Welfare Body.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2015.II.243.038
2. Titel van het project : Study of dietary intervention with human milk oligosaccharides in order to improve immune development
3. Titel van de NTS : Effect van voeding op de ontwikkeling van een gezond afweersysteem

4. Type aanvraag:

- ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
- ☐ wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht

Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247

Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ☒ ontvangen door DEC: 20-11-2015
- ☐ aanvraag compleet:
- ☒ in vergadering besproken: 02-12-2015 en 13-01-2016
- ☐ anderszins behandeld:
- ☒ termijnonderbreking(en) van / tot : 14-12-2015 tot 23-12-2015
21-01-2016 /27-01-2016 tot 02-02-2016
- ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- ☐ aanpassing aanvraag:
- ☒ advies aan CCD: 02-03-2016

7. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Strekking van de vraag / vragen:
- Strekking van het (de) antwoord(en):
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag:

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 14-12-2015
- Strekking van de vraag / vragen:

Aanvraagformulier projectaanvraag

- U hebt hier de eerste geldstroom ingevuld. De DEC heeft echter het vermoeden dat het gaat om de vierde geldstroom. Graag toelichten en eventueel aanpassen.

Niet Technische Samenvatting

- 3.1, beschrijving doelstellingen: De DEC verzoekt u beter te beschrijven wat precies het doel is van dit project (zie ook 3.1 van het projectformulier). Graag het hele stuk herschrijven.
- 3.4, verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdierendieren: Hier wordt de indruk gewekt dat aan het einde van de proef de zwelling op de injectieplaats gemeten wordt. Dit is naar de mening van de DEC feitelijk onjuist.

Projectvoorstel

- 3.1, achtergrond: Het valt de DEC op dat u eerst beargumenteert, onder verwijzing naar een aanbeveling van de WHO, dat het geven borstvoeding belangrijk is. Uit het vervolg wordt echter niet duidelijk waarom het dan toch belangrijk is om het product met HMOS waar het in deze aanvraag over gaat te ontwikkelen. Het is nu onvoldoende duidelijk waarom dit nodig is, gezien het feit dat borstvoeding de eigenschappen heeft die u zoekt. Graag het verhaal logischer maken, ook in de NTS, zodat de lezer begrijpt waarom het toch nodig is een ander product te ontwikkelen.
- 3.1, achtergrond: Uit de achtergrond lijkt duidelijk te worden dat het u gaat [REDACTED]
[REDACTED], iets dat in veel gevallen ook een probleem is als er wel borstvoeding wordt gegeven. Graag ook dit zo opschrijven dat het logisch aansluit bij de lijn van uw verhaal.
- 3.1, achtergrond: De DEC verzoekt u de laatste zin uit de achtergrond te verwijderen of te verplaatsen naar 3.2. Graag aanpassen.
- 3.2, doel: De DEC raadt u aan de genoemde subvragen te verplaatsen naar 3.4. In feite zijn het namelijk stappen in uw onderzoeksstrategie die beter passen voorafgaand aan het schema in 3.4.
- 3.2, doel: De DEC verzoekt u na de eerste alinea een toelichting te geven over de haalbaarheid van de doelstellingen van de studie (dit wordt namelijk expliciet gevraagd: explain why this objective is achievable).
- 3.2, doel: Als u meent dat [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] Als u dat niet doet, waarom dan niet?
- 3.3, belang: Het wordt onvoldoende duidelijk waarom het belangrijk is om dit product te ontwikkelen, terwijl borstvoeding eerste keus is. Graag beter onderbouwen.
- 3.4 onderzoeksstrategie, 3.4.2, fase 2: De DEC verzoekt u de eerste zin (Previous studies...) ook in 3.1 te noemen, ter verduidelijking.

- 3.4, onderzoeksstrategie: De DEC verzoekt u te noemen dat uit eerder onderzoek met muizen bekend is dat wanneer moeders oligosacchariden krijgen, dit een meetbaar effect heeft op de pups.
- 3.4, onderzoeksstrategie: [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED], graag preciezer formuleren wat u hier bedoeld.

Bijlage

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC verzoekt u aan te geven of de moeders ook worden opgevoerd als proefdieren.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters, breeding protocol: De DEC verzoekt u een apart schema te maken van de proef waarbij duidelijk wordt wanneer de moeders HMOS krijgen en vervolgens wanneer melkmonsters worden afgenomen.
- B. De Dieren: U komt in uw berekening uit op 1487, in plaats van de hier door u genoemde 1500. Graag toelichten of en waarom de overige 13 dieren gebruikt worden. Tevens vraagt de DEC zich af of de 30 moeders waarvan melkmonsters worden afgenomen zijn opgenomen in dit getal. Tenslotte merkt de DEC op dat de mannelijke dieren die gebruikt worden voor het fokken, niet opgenomen hoeven te worden als proefdier.
- J. Humane eindpunten: Onder D noemt u het wegen van de dieren, maar dit komt niet terug in J. Graag in beide punten noemen of helemaal weglaten. Als u ervoor kiest dit te noemen, dan ook graag een criterium opnemen (bv. ...>15% gewichtsverlies in twee dagen of >20% over de gehele proef). Graag aanpassen.
- L. Wijze van doden: De DEC verzoekt u de anesthesie op te nemen in de tekst.

Extra bijlage

- U gebruikt voor de powerberekening een power van meer dan 90%. De DEC aanvaardt over het algemeen een power tussen de 80-90%. Graag motiveren waarom u een hogere power aanhoudt.
- Het is de DEC niet duidelijk waarom een [REDACTED]
[REDACTED]. Is dit op enigerle wijze gevalideerd? Graag toelichten.
- De DEC verzoekt u voortaan geen extra bijlagen meer mee te sturen met informatie die eigenlijk gewoon in de aanvraag thuishoort. Een extra bijlage dient u alleen te gebruiken voor informatie (bijvoorbeeld een schema) die om praktische redenen niet in de aanvraag opgenomen kan worden (past niet in de layout; instellingen van het Worddocument laten het niet toe etc.)
- Datum antwoord: 23-12-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en):
Aanvraagformulier projectaanvraag

- Door de samenwerking met [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

Niet Technische Samenvatting

- 3.1, beschrijving doelstellingen: NTS 3.1 en 3.2 zijn geheel herschreven zie NTS
- 3.4 Negatieve gevolgen voor welzijn van de proefdieren: Muizen krijgen 2x een onderhuidse injectie met daarin een [REDACTED] (deze wordt op de rug geplaatst en is inderdaad niet de plaats van de zwelling meting). Net als bij de mens geeft dit geen bijwerkingen, behalve misschien een kleine zwelling. Aan het einde van de proef wordt de [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

In NTS 3.4 is deze toelichting verwerkt.

Projectvoorstel

- 3.1, achtergrond: We will include the notification that although UNICEF as well as the WHO recommend breastfeeding, it is still less known what the individual contribution of breast milk specific components is to the development of the immune system.
Moreover, with the obtained knowledge on the individual specific components present within breast milk, it will be possible to improve formula for infants who cannot be provided with breast milk for any reason.
= Added to the text to 3.3-page 4
- 3.1, achtergrond: In addition we will make clear that: The development of the immune system is dependent on several environmental factors including the microbiome. This interaction has an impact on the efficiency of the [REDACTED] response, which is an aspect of relevance to study also when breastfeeding is provided
= Added to the text to 3.1-page 2.
- 3.1, achtergrond: The last sentence from the background is removed.
- 3.2, doel: The effect of HMOS on the immune system [REDACTED]
[REDACTED] Therefore we have indicated within the protocol, that at several time points fecal samples will be collected.
- The influence of the Microbiome is mentioned in the hypothesis and added to appropriate research questions to 3.2-page "3"
- 3.3, belang: Although provision of breastfeeding remains first choice, it is less known what the individual contribution of breast milk specific components is to the development of the immune system. Moreover, with the obtained knowledge on the individual specific components present within breast milk, it will be possible to improve formula for infants who

cannot be provided with breast milk for any reason. In addition, obtained knowledge may in the future also be used to support people with failing or reduced immune capacity.

-Added to 3.3 –page “4”

- 3.4, onderzoeksstrategie: The first sentence in 3.4.2, fase 2: (previous studies.....) is added to section 3.1 for clarification.
- 3.4, onderzoeksstrategie: We included two references that the supplementation with oligosaccharides in female mice has a measurable effect on the pups. For example, in an allergic asthma mouse model, the measurable effects in the offspring whose mothers were fed with scGOS/lcFOS/pAOS during pregnancy have been shown by Hogenkamp et al (Hogenkamp, 2015). Similar effects have also been detected on the pups from oligosaccharides-fed mothers (Reiko 2010).

= Added to 3.4.2-page 6 and also reference is added to “references”-page 9.

- 3.4, onderzoeksstrategie: [REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

We rephrased and added info to 3.4 – page “6”

Bijlage

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: The mothers are included within the animal numbers although they will not receive [REDACTED]. As stated in the protocol by adding “female animals used for breeding are included while male animals are excluded in the calculation of test animals.” to A – page “11”.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters, breeding protocol: Within experiment 12, three groups are added in order to analyze the mice milk. And a separate diagram of the test in which when mothers get HMOs and then when milk samples are taken is provided by adding “Figure 2” to A – page “3”.
- B. De Dieren: In our final calculation we request to use an exact total of 1460 mice:
 - 166 mice for Fase 1
 - 803 mice for Fase 2
 - 428 mice for Fase 3 (including, 282 pups, 116 female breeders, 30 moms for milk samples, excluding the male breeders). 63 extra mice are included taken into account that 5% of the mice may be non-response to vaccination according to our experience and literature. A table indicating the detail of animal amount is added to the text to A – page “8”. The 58 male animals for breeding, who will not be vaccinated, will not be included as experimental animals, but will be mentioned within the protocol, as indicated above.
- J. Humane eindpunten: We did not mention weight change as marker for humane end point as we do not expect a drastic change in weight during any of the procedures. However to be

more consistent throughout the protocol, we will include the change in weight as >20% during the entire experiment as criteria.

-Added to the text as "the change in weight as >20% during the entire experiment, animals are euthanized" to J-page "11".

- L. Wijze van doden: The use of Isoflurane anesthesia prior to the end of the experiment is added to the text as "All animals will be killed at the end of the experiment by cervical dislocation, before which Isoflurane anesthesia will be applied to animals." to L- page "11".

Extra bijlage

- Since expected relevant changes will be expected to be small changes (i.e. down to 10%), we would like to use the high power in order to optimize the chance of finding a significant difference between the groups.

In previous studies it is shown that optimal individual interventions can have effects up to 40%, we consider 1/4th of this optimal effect already one to be of relevance to further investigate. (Vos et al 2007)

- Since the statistical calculation and support to the program required input from an independent statistical expert, we did not want to withhold any of this information to the DEC. Therefore, this was provided as an additional addendum.
- Datum: 21-01-2016
Strekking van de vraag / vragen:

Extra bijlage

- De DEC kan zich nog niet vinden in uw argumentatie om een hogere power dan gebruikelijk te hanteren. Als u kleine verschillen verwacht, dan zal uit de powerberekening komen dat u grotere groepen dieren dient te gebruiken om tot een significant resultaat te komen. Door daarnaast ook nog met een extra hoge power van 95% te werken verhoogt u het aantal dieren nogmaals. Dit laatste is in de ogen van de DEC onnodig als daar geen goede andere argumenten voor zijn. De DEC verzoekt u de powerberekening nader toe te lichten en raadt u aan om eventueel met een statisticus te overleggen over het berekenen van de power.

- Datum: 27-01-2016
Strekking van de vraag / vragen:

Projectvoorstel

- 3.2. Doel: Er is niet vermeld waarom de doelstellingen in de projectaanvraag haalbaar worden geacht, terwijl dit wel wordt gevraagd. Graag toevoegen.

Extra bijlage:

- De DEC adviseert u om de genoemde informatie uit de extra bijlage toch nog toe te voegen/te integreren bij de desbetreffende onderdelen in de reguliere aanvraag. De

verschillende presentatie omtrent de dieren aantallen in de reguliere bijlage en de extra bijlage roept mogelijk vragen op bij de CCD. In de reguliere bijlage bij onderdeel 2A is het afdoende om aan te geven welke statistische methode wordt gebruikt om het aantal dieren te berekenen. Bij onderdeel 2B moet worden vermeld wat het totale aantal dieren is en hoe dat aantal tot stand is gekomen. In de extra bijlage wordt een voorbeeld gegeven van 5 groepen met een $n=10$. Het is momenteel niet helder genoeg hoe deze berekening zich verhoudt met de genoemde aantallen in de reguliere bijlage, onderdeel 2B.

- Bijlage, onderdeel 2H, is onvolledig ingevuld; Graag volledig beantwoorden (dus ook het tweede deel van de vraag dat is weggefallen in de versie die de DEC heeft ontvangen).
- Datum antwoord: 02-02-2016
- Strekking van het (de) antwoord(en):
Projectvoorstel
- 3.2, Doel: Er is niet vermeld waarom de doelstellingen in de projectaanvraag haalbaar worden geacht, terwijl dit wel wordt gevraagd. Graag toelichten: We regard the objective as achievable because: 1. Within our department, techniques for vaccinating mice have been well established (Vos et al 2006; Vos et al 2007 etc), as well as the proposed parameters based on our experience 2. Our hypothesis (objective) is theoretically possible according to the literature and based on our current knowledge about human milk oligosaccharides.
- Added to the text to 3.2-page 3.

Extra bijlage

- De DEC kan zich nog niet vinden in uw argumentatie om een hogere power dan gebruikelijk te hanteren. Als u kleine verschillen verwacht, dan zal uit de powerberekening komen dat u grotere groepen dieren dient te gebruiken om tot een significant resultaat te komen. Door daarnaast ook nog met een hogere power van 95% te werken verhoogt u het aantal dieren nogmaals. Dit laatste is in de ogen van de DEC onnodig als daar geen goede andere argumenten voor zijn. De DEC verzoekt u de powerberekening nader toe te lichten en raadt u aan om eventueel met een statisticus te overleggen over het berekenen van de power: -As suggested the statistical power calculation document has been integrated within the project proposal. In addition, We consulted a statistician and agree to use power=0.90, and changed the animal number from 10 per group into 9 per group accordingly based on the power=0.90. The corresponding numbers have also been changed in the text in A, Experimental strategy in page 5; B, The animals, page 6;
- Bij onderdeel 2B moet worden vermeld wat het totale aantal dieren is en hoe dat aantal tot stand is gekomen. In de extra bijlage wordt een voorbeeld gegeven van 5 groepen met een $n=10$. Het is momenteel niet helder genoeg hoe deze berekening zich verhoudt met de genoemde aantallen in de reguliere bijlage, onderdeel 2B: We stated the total number of animals as 1319 which is recalculated upon 9 mice per group. An extra table has been added in B. page 6 to state how the total number is calculated.

- Bijlage, onderdeel 2H, is onvolledig ingevuld; Graag volledig beantwoorden (dus ook het tweede deel van de vraag dat is weggefallen in de versie die de DEC heft ontvangen). The second part of the question has been answered. –H. page 8.

Extra bijlage

- In de extra bijlage wordt een voorbeeld gegeven van 5 groepen met een n=10. Het is momenteel niet helder genoeg hoe deze berekening zich verhoudt met de genoemde aantallen in de reguliere bijlage, onderdeel 2B: Group size has been corrected to 9, which stick to the number per group in 2B. – Page 5
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag:

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

- Aard expertise:
- Deskundigheid expert:
- Datum verzoek:
- Strekking van het verzoek:
- Datum expert advies:
- Expert advies:

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - ☒ uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
 - ☐ uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
 - ☐ uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
 - ☐ wettelijk vereist.
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. Het project probeert te ontrafelen welke componenten in moedermelk bijdragen aan de ontwikkeling en stimulatie van een gezond immuunsysteem. De ontwikkeling van het immuunsysteem is afhankelijk van een aantal interne en externe factoren.

[redacted]
[redacted]
[redacted] rol kan spelen op het microbioom en het
immuunsysteem. Het is momenteel niet duidelijk welke specifieke componenten van de
moedermelk de beschermende effecten teweegbrengen. [redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted] Baby's die geen of onvoldoende moedermelk
kunnen drinken, kunnen op deze manier een [redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de
doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschrijven hun project in een
drietal fases. De onderzoeksvragen behorend bij de verschillende fases zijn duidelijk
geformuleerd en toetsbaar. Er is duidelijk aangegeven in welke volgorde de experimenten
worden uitgevoerd binnen de fases. Bovendien wordt er pas verder gegaan met de volgende
fase wanneer een significant positief effect is behaald uit de voorgaande fase. De 3 te testen
specifieke componenten in moedermelk (HMOS) zijn geïdentificeerd op basis van voorgaande
onderzoeken door dezelfde onderzoeksgroep en op basis van literatuur. [redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted] [redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]

[redacted]. De DEC is ervan overtuigd
dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling
met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. In DEC nummer
2013.II.06.070 is door de onderzoekers al veel expertise opgedaan met pasgeboren muizen.

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

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

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd.

Het ongerief wordt door de onderzoekers als licht ingeschat. [REDACTED]

[REDACTED] Direct daarna wordt het dier gedood en komt niet een 2^e keer bij van de anesthesie. Daarnaast worden de dieren geschoren ter identificatie en wekelijks gewogen. Het ongerief wordt door de DEC geclassificeerd als licht voor alle dieren (100%). Er wordt niet verwacht dat de experimentele handelingen zullen leiden tot een humaan eindpunt. De kans dat een humaan eindpunt wordt bereikt door onvoorziene omstandigheden, zoals gewichtsverlies van het dier, is kleiner dan 2%.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. De reactie van het lichaam op de specifieke voedingscomponenten en de vaccinatie zijn het resultaat van complexe processen in het lichaam, waarbij het afweersysteem en vooral de ontstekingscellen een grote rol spelen. [REDACTED]

[REDACTED] kan het onderzoek niet bij de mens uitgevoerd worden en ook niet op celsystemen of met wiskundige computermodellen.

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De onderzoekers maken gebruik van een negatieve controlegroep van 3 dieren om te controleren of er geen zwelling in het oor optreedt, 24h na een injectie in het oor, wanneer niet vooraf 2 vaccinaties zijn gegeven. Deze negatieve controlegroep is noodzakelijk om zeker te zijn van de effecten van de 2 vaccinaties, maar hoeft niet te worden gebruikt voor statistische vergelijkingen. Op basis van eerdere ervaringen in deze onderzoeksgroep is het afdoende om 3 dieren te gebruiken in plaats van de beoogde 9 dieren berekend uit de poweranalyse, aangezien de groep niet wordt meegenomen in statische analyses na afloop van het experiment. Daarnaast wordt, omdat het experiment wordt uitgevoerd in verschillende fases, alleen de beste HMOS en de concentratie van deze HMOS gebruikt in fase 3 van het project. De DEC is van mening dat het maximaal aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzichte van de gekozen strategie en looptijd van 5 jaar.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. De onderzoeksgroep heeft ruim 15 jaar ervaring met de beschreven experimenten en verwacht op grond van die ervaring dat er tijdens het experiment geen dieren dood zullen gaan of onnodig zullen lijden. Doordat het project is opgezet in verschillende fases wordt bovendien eerst getest of de gebruikte [REDACTED] efficiënt werken. Binnen de onderzoeksgroep zijn verschillende technieken opgezet, welke telkens zijn verbeterd om de [REDACTED] [REDACTED] Omdat kan worden verwacht dat de injectie in de huid van het oor pijnlijk is, wordt deze injectie uitgevoerd onder isofluraan anesthesie.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op grond van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende afweging. Het beschreven project heeft als [REDACTED]

[REDACTED] De uitkomsten van dit onderzoek dragen substantieel bij aan het begrijpen van de mechanismen achter de immuunmodulerende effecten van specifieke componenten in moedermelk. [REDACTED]

[REDACTED] De DEC is van mening dat het projectvoorstel vanuit wetenschappelijk oogpunt verantwoord is en de vertaling van de onderzoeksresultaten naar de mens wordt mogelijk geacht. De gestelde doeleinden kunnen worden gehaald binnen de gevraagde termijn. De onderzoeksgroep veel ervaring heeft met de beschreven diermodellen. De DEC acht, alles overziend, het belang van dit onderzoek daarom substantieel.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat alle dieren maximaal licht ongerief zullen ondervinden, met name als gevolg van de injecties, het bijkomen uit een kortdurende lichte anesthesie en mogelijk ook enige pijn door zwelling van het oor. De DEC is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat

het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
- ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- ☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

Dierexperimentencommissie Utrecht



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht



Postbus 12007

3501 AA UTRECHT UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002016460

Bijlagen

2

Datum 10 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 8 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002016460. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10800

Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht

Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde:

KvK-nummer: 30275924

Straat en huisnummer:

Postbus: 12007

Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT UTRECHT

Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie:

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 mei 2016
Geplande einddatum: 1 april 2021
Titel project: Study of dietary intervention with human milk oligosaccharides in order to improve immune development
Titel niet-technische samenvatting: Effect van voeding op de ontwikkeling van een gezond afweersysteem
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Huispostnummer D01.343, Postbus 85500, 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 935,-
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:



Functie:



Plaats:

Utrecht

Datum:

7 maart 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU -ASC
Postbus 80.011
3508 TA UTRECHT


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002016460
Bijlagen
2

Datum 10 maart 2016
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 10 maart 2016
Vervaldatum: 9 april 2016
Factuurnummer: 16700460
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002016460	€ 935,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007
3501 AA Utrecht

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002016460

Uw referentie

Datum 12 mei 2016
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen
1

Geachte [REDACTED]

Op 10 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Study of dietary intervention with human milk oligosaccharides in order to improve immune development" met aanvraagnummer AVD108002016460. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij geldt de algemene voorwaarde zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "Study of dietary intervention with human milk oligosaccharides in order to improve immune development" starten. De vergunning wordt afgegeven van 12 mei 2016 tot en met 01 april 2021. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 02 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is het advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij nemen dit advies van de commissie over. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit. Met het oog op artikel 10a, lid 1, is een algemene voorwaarde toegevoegd.

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 de rechter kantlijn in deze brief.

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

Datum

12 mei 2016

Onze referentieAanvraagnummer
AVD108002016460

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

Meer informatie

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

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



H. 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: Universiteit Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en woonplaats: 3501 AA Utrecht
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 12 mei 2016 tot en met 01 april 2021, voor het project "Study of dietary intervention with human milk oligosaccharides in order to improve immune development" met aanvraagnummer AVD108002016460, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 10 maart 2016;
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 10 maart 2016;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 10 maart;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie d.d. 02 maart 2016, zoals ontvangen op 10 maart 2016;

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1. Study of dietary intervention in a vaccination model in mice.	Muizen (Mus musculus)	1319	Licht

Algemene voorwaarde

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning.

Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Datum

12 mei 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD108002016460

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.