

Inventaris Wob-verzoek W17-07										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 2016633	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x		x	x		
4	bijlage animal procedure 2				x		x	x		
5	bijlage animal procedure 1 aangepast				x		x	x		
6	bijlage animal procedure 2 aangepast				x		x	x		
7	bijlage animal procedure 1 aangepast				x		x	x		
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
9	Mail verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
10	Mail verzoek om aanvullende informatie - 2				x		x	x		
11	DEC advies				x		x	x		
12	Advies CCD		x						x	
13	Beschikking en vergunning				x		x	x		

02 NOV. 2016



Centrale Commissie Dierproeven

1

AVD401002016 633

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	40100
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Stichting Wageningen Research
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	
		KvK-nummer	908104
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	Akkermaalsbos 12
		Postbus	59
		Postcode en plaats	6700 AB Wageningen
		IBAN	NL10RABO0397066465
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR
		(Titel) Naam en voorletters	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Onderzoeker
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input 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 | 1 - 11 - 2016 |
| Einddatum | 1 - 11 - 2021 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- In ovo immune-stimulator
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Bescherming van pasgeboren kippen tegen sterfte door E. coli infecties
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|--------------------|
| Naam DEC | DEC-WUR |
| Postadres | 6700 HB Wageningen |
| E-mailadres | DEC@wur.nl |

4 Betaalgegevens




- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1187 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 + 2 bijlagen
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- ~~XXXXXXXXXX~~ Bestelorder 
-

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	
Functie	
Plaats	Wageningen
Datum	28 - 10 - 2016
Handtekening	



Form Project proposal

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 40100
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek
- 1.3 Provide the title of the project. In ovo immune-stimulator

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

The underlying motivation for this project, to which this application refers, is to achieve decreased use of antibiotics in farm animal industry. It aims for improving immunocompetence and subsequently incidences of infectious diseases. It's main objective is to establish efficacy of immunostimulants (IS) – non-specific immunostimulating agents - that through augmentation of the immune response confer

animals an enhanced resistance to infection (Patil *et al.*, 2011, Int. Jrnl. of pharmacy and pharmaceutical sciences, 4, 30-36).

Various modes of IS have been used in the past and one recently discovered and introduced is based on the use of DNA-liposome complexes. Such a non-antibiotic agent is used in the US successfully to treat bovine respiratory infections. This complex of diseases can be caused by viral pathogens (BHV1, BRSV, PI 3, BVD) or bacterial pathogens (Pasteurella, Manheimia, Haemophilus or Mycoplasma).

It also has shown to be effective in treating *E. coli* infections in poultry, when applied *in ovo*. Avian colibacillosis is considered as one of the principal causes of morbidity and mortality in poultry (Kemmet *et al.*, 2014, Avian Pathology, 43, 37-42). It causes heavy economic losses to the poultry industry by its association with various disease conditions, either as primary pathogen or as a secondary pathogen. It has been estimated that in the Netherlands on a yearly basis 2.8% of broilers die from septicaemia caused by *E. coli* infections in the first week after hatch (Monitor Diergezondheid, GD 2015). This equals to approximately 10 million broilers.

Avian pathogenic *E. coli* (APEC) strains are often resistant to antimicrobials approved for poultry including cephradine, tetracyclines, chloramphenicol, sulfonamides, amino-glycosides and β -lactam antibiotics. Resistance to fluoroquinolones was reported within several years of the approval of this class of drugs for use in poultry. The great diversity among APEC strains limits the possibilities of vaccination, and vaccines are not used on a large scale. Several vaccines based on killed or attenuated strains have been tested experimentally. In general, they give sufficient protection against infection with homologous strains, but protection against heterologous strains is less efficient (Kabir *et al.*, 2010, 7, 89-114).

3.2 Purpose

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

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

The above mentioned IS on the basis of DNA-liposome complexes has shown efficacy in clinical trials, but it is expected that pharmacological refinement of the product will result in higher efficacy. The current product is aimed for treating *E. coli* infection in poultry caused by APEC and is based on a product used in the US but includes several improvements. Therefore immunostimulating DNA-liposome complexes and optimized variants will be tested in an *in ovo* application for the treatment of experimentally infected chicken with an avian pathogenic *E. coli* strain. The experimental design is based closely on similar experiments that proved efficacy for the *in ovo* treatment against colibacillosis in chicken in the US.

3.3 Relevance

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

More knowledge will be developed on IS; in particular on their design and improving efficacy. It is obvious that reducing the use of antibiotics in livestock industry and thereby the risk of evolving antibiotic resistance is of great social relevance by its implications for human and animal health. Therefore replacing therapeutic antibiotics for preventive IS will contribute to this aim. As a more direct benefit, use of IS will also contribute to animal health by improving resilience and immunocompetence.

3.4 Research strategy

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

Based on pharmacological compound analysis, new variants of IS are developed following the concept of DNA-liposome complex that stimulate the host innate immune response. In first instance the efficacy for treating colibacillosis in poultry will be tested. IS that show comparable or better efficacy could subsequently be tested for the treatment of Bovine Respiratory Diseases.

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.

Immunostimulants (IS) are designed based on the chemical composition of DNA-liposome complex and in compliance to European legislation. To test their efficacy (animal procedure serial number 2) fertilized eggs at three days before hatching (D18) will be injected with a dose of the IS in the amnion cavity of the egg. At D19 eggs will be challenged by spraying egg surfaces with Avian Pathogenic *E. coli* (APEC)

after which eggs are infected through the punctured hole caused by IS-injection at D18. Mortality will be observed from hatching to one week after hatching.

Prior to the *in ovo* challenge experiment it will be necessary to confirm in a pilot study (animal procedure serial number 1) conditions that enable a statistical significant observation of reduction of mortality. When aiming for an improvement a more than 30% reduction of mortality should be observed. In a previous study this equalled to a reduction of >10% at hatch and >55% 7 days post-hatch

These conditions will primarily depend on the APEC strain, used for the experimental infection and need to cause an average mortality of 35% in untreated animals to practically enable the detection of effects by treatment. Additionally the pilot study should also assess if expected discomfort to animals is minimized by the humane endpoint decision scheme installed (see appendix clinical score and HEP decision scheme). This scheme has been described by *Gunawardana et al.* (Avian Disease 59:31-37, 2015), and used for experimental infection experiments of neo-natal chicken with *E. coli* and as such approved by Canadian Council in Animal Care.

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.

Timeline of work plan

1. IS synthesized (milestone) and available
2. Confirm challenge conditions (animal procedure serial number 1)
Different APEC strains (3), confirmed by PCR, will be tested in selected type of chicken breed. Strains that show an average mortality of about 35 % are suited for subsequent challenge experiment. (go - no go).
Morbidity and mortality of individual animals will be scored in time from hatch till 7 days post-hatch, according to a clinical score scheme. This data will be used to optimize the HEP decision scheme to minimize discomfort of animals. Subsequent trials will be carried out using this scheme.
3. Challenge and IS treatment. (animal procedure serial number 2)
Different IS will be tested in two doses to measure efficacy of reduction of mortality after challenge with APEC strain.
In the first challenge/treatment-trial an IS will be tested that is expected to have an effect of 30% reduction of mortality, which means that the minimal group size have to be 300 animals, in order to assess effect of treatment. Data from clinical scores will be used to adjust set-up for subsequent trials. This concerns a minimization of group size and duration of post-challenge period, still allowing for statistical significant assessments of treatment effects. Subsequent trials will follow this experimental set-up.
4. Next trials will encompass new improved variants of IS. IS that show ≥ 30 % average reduction of mortality are considered as successful and are suited to test for broader applicability.

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	<i>In ovo</i> Immunostimulator_Pilot
2	<i>In ovo</i> Immunostimulator Challenge
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.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 2	Type of animal procedure <i>In ovo</i> Immunostimulator Challenge

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.

Fertilized eggs will be infected by spraying egg surfaces with different doses of Avian Pathogenic *E. coli* (APEC). Since neonatal colibacillosis caused by APEC leads to acute mortality by septicaemia, mortality at experimental infection embryonated eggs will be treated by injecting an immunostimulant (IS) in the amnion cavity.

The main purpose of this animal procedure is to assess the efficacy of reduction of mortality caused by APEC infection by the use of immunostimulants.

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

Fertilized eggs at three days (D18) before hatching (D21) will be injected with a needle with IS in the amnion cavity of the egg. At D19 eggs will be challenged by spraying egg surfaces with about 10^7 CFU/egg of Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) by which eggs are infected via the punctured hole still present from IS-injection at D18. Mortality at and until one week after hatching will be scored. Different IS will be tested with two (0,1 and 1 ug) doses and compared with two controls groups (untreated-challenged (UC), untreated-unchallenged (UU)). Each treated and challenged group (T(reated)C) will comprise of 300 chickens (fertilized eggs) except the UU-group (80 animals). In the first challenge/treatment-trial only one IS will be tested that is expected to have an effect of 30% reduction of mortality. This means that the minimal group size have to be 300 animals, in order to assess effect of treatment. For this first trial 980 animals are needed, i.e. ((2 (doses) x 300 (TC)) + 300 UC + 80 (UU)). Following trials will proceed after an UU evaluation of the first challenge/treatment experiment to enable adjustment of group sizes in order to minimize animal discomfort, or, in the event of an observed higher mortality rate than expected, to reconsider ethical decisions made. Statistical analysis

will be carried out by using a **two-proportion z-test**.

Subsequent experiments will test six improved variants of IS.

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

When aiming for an improvement a more than 30% reduction of mortality should be observed. In a previous (US-)study this equalled to a reduction of >10% at hatch and >55% 7 days post-hatch [REDACTED] and were based on an average mortality of 35% of untreated/challenged animals. Data from clinical scores from the first treatment/challenge trial will be used to adjust set-up for subsequent trials. This concerns a minimalization of group size and duration of post-challenge period, still allowing for statistical significant assessments (with 80% statistical power) of treatment effects. Subsequent trials will follow this experimental set-up. Without this minimalization number of animals per subsequent trials would be 1580 (2 (doses) x 2 (IS's) x 300) +300 (UC) +80 (UU).

B. The animals

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

Animal species: chicken. Preferred animal species because the host-specificity of the pathogen (APEC) and the relevant economic implications of the animal disease caused by APEC. Animal procedure will start with fertilized eggs purchased from a certified supplier. After hatching animals will kept for one week. Maximum total number of animals to test six new IS, is 10460 (6 (IS) x 1580) + 980 (first trial)). There are 6 new IS developed for testing. It is expected that at least one IS will meet the expectation of causing at least 30% reduction in mortality. When prior to the sixth planned experiment an IS is found with this target reduction, further experiments could be avoided if only mentioned reduction should be achieved, but then one also loses the ability to find an IS with an even stronger reduction. Therefore 6 tests warrant to find IS with the highest reduction of mortality.

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.

Chicken is the target organism for (Avian Pathogenic Escherichia coli) APEC infections. Other animal species are not relevant. The hypothesized mode of action of the immunostimulant is to elicit an earlier and/or stronger induction of the innate immune response through binding of cell receptors of the immune system and subsequent activation of several pathways by signal transduction. Although some of these effects can be, and have been, tested in vitro before an in vivo testing even was considered, accurate predictions of protection against lethal APEC infections still cannot be made.

Number of animals per group have been reduced by using data from a previous trial [REDACTED] from 1600 to 300 which still allows for a statistical significant assessment of treatment effects.

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

Animals are kept on a bedding of wood shavings to stimulate foraging behaviour. Water and food is available immediate after hatching.

After hatching, chicks will be observed 5 or 3 times a day according to clinical score scheme (table 1) and humane endpoint decisions will be made. Initially these observations will be made evenly distributed over 24 hours of a day, but shall be adapted to shorter intervals in anticipation of expected peak of mortality. Mortality will be caused by sepsis and occurs very fast (usually within 3 hours). Sepsis will cause a short period of severe suffering, therefore observed symptoms of sepsis will lead to a humane endpoint decision. Animals will be euthanized by cervical dislocation.

Clinical score Colibacillosis neonatal chicken	
Score	Clinical observation
0	Normal
0,5	slightly abnormal-inactive appearance, slow to move
1	depressed, reluctant to move
1,5	reluctant to move, may take a drink and peck at feed occasionally
2	unable to stand or reach food or water
3	found dead
	HEP at ≥ 2
	Until 2 days post-hatching: 5 observations/day: individual animals
	After that 3 observations/day

Table 1. Clinical score scheme and HEP decision

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.

Although the animal procedure is based on an efficacy proven IS, improved IS-variants tested in this procedure haven't been tested before to treat APEC infection in chicken.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

The major reason not to apply analgesia is the fact that this would compromise the aim of the study; e.g. it might interfere with the IS. Secondly, due to the short period of suffering during septicaemia analgesia cannot be applied. Instead, mostly animals will be euthanized when showing symptoms of septicaemia.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Sepsis will cause discomfort and expectedly a short period of severe suffering.

Explain why these effects may emerge.

Sepsis will cause a reduced blood flow and subsequent organ failure leading to death.

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

Next to the use of minimal size of treatment groups, animals are monitored 2-3 times a day. When symptoms of sepsis are observed a humane endpoint will be applied (see below).

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.

Animals are evaluated 5 times daily at the critical stage (until two days post-hatch) and then 3 times a day thereafter for 7 days post hatch (see table 1). Initially these observations will be made evenly distributed over 24 hours of a day, but shall be adapted to shorter intervals in anticipation of expected peak of mortality. Birds that received a clinical score of 2 will be euthanized by cervical dislocation. With this increased observation frequency in the beginning of the infection most animals with sepsis will be euthanized based on HEP.

Indicate the likely incidence.

It is expected that < 35 % of APEC infected animals will die from sepsis.

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').

A maximum of 35 % of animals per trial will experience severe discomfort caused by symptoms of sepsis, while the remaining and surviving animals experience mild discomfort.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

All remaining animals will be killed at the end of the animal phase at one week of age. Since animals have been infected with Avian Pathogenic *E. coli* there is no possibility for another housing outside the containment of animal experiment.

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	1	In ovo Immunostimulator Pilot

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.

Fertilized eggs will be infected by spraying egg surfaces with Avian Pathogenic *E. coli* (APEC). Since neonatal colibacillosis caused by APEC leads to acute mortality by septicaemia, mortality at and until one week after hatching will be the primary outcome parameter.

The main purpose of this experimental infection is to establish conditions for three different APEC strains with respect to available type of chicken breed that enables detection of at least 30% reduction of mortality by a preventive treatment with an immunostimulant (IS).

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

Fertilized eggs at three days (D18) before hatching (D21) will be sham-injected with a needle with 5% dextrose in water in the amnion cavity of the egg. At D19 eggs will be challenged by spraying egg surfaces with 10^7 CFU/egg of Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) through which eggs are infected via the punctured hole still present from Sham-injection at D18. Mortality at and until one week after hatching will be scored.

Three different APEC strains will be tested (treatment groups T2, T3 and T4 and compared with a control group T1. Every group will comprise of 80 animals (fertilized eggs).

To assess inter-experimental variation one repetition with one of the selected APEC strains (T1 and one from T2-4) will be needed. Total number of animals needed are 480, i.e. $4 (T_{1-4}) \times 80$ (Group size) + Repetition 2×80 .

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

When aiming for an improvement a more than 30% reduction of mortality should be observed in a subsequent challenge/treatment experiment. In a previous (US-)study this equalled to a reduction of >10% at hatch and >55% 7 days post-hatch [REDACTED]

[REDACTED] These conditions will primarily depend on the APEC strain, used for the experimental infection and need to cause an average mortality of 35% in untreated animals to practically enable the detection of effects by treatment. The minimal group size that enables statistical significant detection (with 80% statistical power) of this mortality rate is 80 animals. Statistical analysis will be carried out by using a two-proportion z-test.

B. The animals

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

Animal species: chicken. Preferred animal species because the host-specificity of the pathogen (APEC) and the relevant economic implications of the animal disease caused by APEC. Animal procedure will start with fertilized eggs purchased from a certified supplier. After hatching animals will kept for one week. Total number of animals for one experiment including one repetition is 480.

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.

Chicken is the target organism for (Avian Pathogenic Escherichia coli) APEC infections. Other animal species are not relevant. The hypothesized mode of action of the immunostimulant is to elicit an earlier and/or stronger induction of the innate immune response through binding of cell receptors of the immune system and subsequent activation of several pathways by signal transduction. Although some of these effects can be, and have been, tested in vitro before an in vivo testing even was considered, accurate predictions of protection against lethal APEC infections still cannot be made.

Number of animals per group have been reduced by using data from a previous trial [REDACTED] from 1600 to 300 which still allows for a statistical significant assessment of treatment effects.

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

Animals are kept on a bedding of wood shavings to stimulate foraging behaviour. Water and food is available immediate after hatching.

After hatching, chicks will be observed 5 or 3 times a day according to clinical score scheme (table 1) and humane endpoint decisions will be made. Initially these observations will be made evenly distributed over 24 hours of a day, but shall be adapted to shorter intervals in anticipation of expected peak of mortality. Mortality will be caused by sepsis and occurs very fast (usually within 3 hours). Sepsis will cause a short period of severe suffering, therefore observed symptoms of sepsis will lead to a humane endpoint decision. Animals will be euthanized by cervical dislocation.

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.

Although the animal procedure is based on a existing animal model, the use of different APEC strains, other type of chicken breed and other minor differences in the technical procedures necessitates the confirmation of the required mortality rate of about 35% to ensure that a subsequent challenge experiment will meet the required conditions.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

The major reason not to apply analgesia is the fact that this would compromise the aim of the study; e.g. it might interfere with the IS. Secondly, due to the short period of suffering during septicaemia analgesia cannot be applied. Instead, mostly animals will be euthanized when showing symptoms of septicaemia.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Sepsis will cause discomfort and expectedly a short period of severe suffering.

Explain why these effects may emerge.

Sepsis will cause a reduced blood flow and subsequent organ failure leading to death.

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

Next to the use of minimal size of treatment groups, animals are monitored 2-3 times a day. When symptoms of sepsis are observed a humane endpoint will be applied (see below).

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.

Animals are evaluated 5 times daily at the critical stage (until two days post-hatch) and then 3 times a day thereafter for 7 days post hatch (see table 1). Initially these observations will be made evenly distributed over 24 hours of a day, but shall be adapted to shorter intervals in anticipation of expected peak of mortality. Birds that received a clinical score of 2 will be euthanatized by cervical dislocation. With this increased observation frequency in the beginning of the infection most animals with sepsis will be euthanatized based on HEP.

Clinical score Colibacillosis neonatal chicken	
Score	Clinical observation
0	Normal
0,5	slightly abnormal-inactive appearance, slow to move
1	depressed, reluctant to move
1,5	reluctant to move, may take a drink and peck at feed occasionally
2	unable to stand or reach food or water
3	found dead
	HEP at ≥ 2
	Until 2 days post-hatching: 5 observations/day: individual animals
	After that 3 observations/day

Table 1. Clinical score scheme and HEP decision

Indicate the likely incidence.

It is expected that about 35 % of treated (APEC infected) animals will die from sepsis.

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').

Approximately 100 animals will experience severe discomfort caused by symptoms of sepsis, while the remaining and surviving animals experience mild discomfort.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

All remaining animals will be killed at the end of the animal phase at one week of age. Since animals have been infected with Avian Pathogenic *E. coli* there is no possibility for another housing outside the containment of animal experiment.

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 2	Type of animal procedure <i>In ovo</i> Immunostimulator Challenge

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.

Fertilized eggs will be infected by spraying egg surfaces with different doses of Avian Pathogenic *E. coli* (APEC). Since neonatal colibacillosis caused by APEC leads to acute mortality by septicaemia, mortality at experimental infection embryonated eggs will be treated by injecting an immunostimulant (IS) in the amnion cavity.

The main purpose of this animal procedure is to assess the efficacy of reduction of mortality caused by APEC infection by the use of immunostimulants.

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

Fertilized eggs at three days (D18) before hatching (D21) will be injected with a needle with IS in the amnion cavity of the egg. At D19 eggs will be challenged by spraying egg surfaces with about 10^7 CFU/egg of Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) by which eggs are infected via the punctured hole still present from IS-injection at D18. Mortality at and until one week after hatching will be scored. Different IS will be tested with two (0,1 and 1 ug) doses and compared with two controls groups (untreated-challenged (UC), untreated-unchallenged (UU)). Each treated and challenged group (T(reated)C) will comprise of 300 chickens (fertilized eggs) except the UU-group (80 animals). In the first challenge/treatment-trial only one IS will be tested that is expected to have an effect of 30% reduction of mortality. This means that the minimal group size have to be 300 animals, in order to assess effect of treatment. For this first trial 980 animals are needed, i.e. ((2 (doses) x 300 (TC)) + 300 UC + 80 (UU)). Following trials will proceed after an evaluation of the first challenge/treatment experiment to enable adjustment of group sizes in order to minimize animal discomfort, or, in the event of an observed higher mortality rate than expected, to reconsider ethical decisions made. Statistical analysis

will be carried out by using a **two-proportion z-test**.

Subsequent experiments will test six improved variants of IS.

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

When aiming for an improvement a more than 30% reduction of mortality should be observed. In a previous (US-)study this equalled to a reduction of >10% at hatch and >55% 7 days post-hatch [REDACTED] and were based on an average mortality of 35% of untreated/challenged animals. Data from clinical scores from the first treatment/challenge trial will be used to adjust set-up for subsequent trials. This concerns a minimalization of group size and duration of post-challenge period, still allowing for statistical significant assessments (with 80% statistical power) of treatment effects. Subsequent trials will follow this experimental set-up. Without this minimalization number of animals per subsequent trials would be 1580 (2 (doses) x 2 (IS's) x 300) +300 (UC) +80 (UU).

B. The animals

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

Animal species: chicken. Preferred animal species because the host-specificity of the pathogen (APEC) and the relevant economic implications of the animal disease caused by APEC. Animal procedure will start with fertilized eggs purchased from a certified supplier. After hatching animals will kept for one week. Maximum total number of animals to test six new IS, is 10460 (6 (IS) x 1580) + 980 (first trial)). There are 6 new IS developed for testing. It is expected that at least one IS will meet the expectation of causing at least 30% reduction in mortality. When prior to the sixth planned experiment an IS is found with this target reduction, further experiments could be avoided if only mentioned reduction should be achieved, but then one also loses the ability to find an IS with an even stronger reduction. Therefore 6 tests warrant to find IS with the highest reduction of mortality.

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.

Chicken is the target organism for (Avian Pathogenic Escherichia coli) APEC infections. Other animal species are not relevant. The hypothesized mode of action of the immunostimulant is to elicit an earlier and/or stronger induction of the innate immune response through binding of cell receptors of the immune system and subsequent activation of several pathways by signal transduction. Although some of these effects can be, and have been, tested in vitro before an in vivo testing even was considered, accurate predictions of protection against lethal APEC infections still cannot be made.

Number of animals per group have been reduced by using data from a previous trial [REDACTED] from 1600 to 300 which still allows for a statistical significant assessment of treatment effects.

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

Animals are kept on a bedding of wood shavings to stimulate foraging behaviour. Water and food is available immediate after hatching.

After hatching, chicks will be observed 5 or 3 times a day according to clinical score scheme (table 1) and humane endpoint decisions will be made. Initially these observations will be made evenly distributed over 24 hours of a day, but shall be adapted to shorter intervals in anticipation of expected peak of mortality. Mortality will be caused by sepsis and occurs very fast (usually within 3 hours). Sepsis will cause a short period of severe suffering, therefore observed symptoms of sepsis will lead to a humane endpoint decision. Animals will be euthanized by cervical dislocation.

Clinical score Colibacillosis neonatal chicken	
Score	Clinical observation
0	Normal
0,5	slightly abnormal-inactive appearance, slow to move
1	depressed, reluctant to move
1,5	reluctant to move, may take a drink and peck at feed occasionally
2	unable to stand or reach food or water
3	found dead
	HEP at ≥ 2
	Until 2 days post-hatching: 5 observations/day: individual animals
	After that 3 observations/day

Table 1. Clinical score scheme and HEP decision

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.

Although the animal procedure is based on an efficacy proven IS, improved IS-variants tested in this procedure haven't been tested before to treat APEC infection in chicken.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

The major reason not to apply analgesia is the fact that this would compromise the aim of the study; e.g. it might interfere with the IS. Secondly, due to the short period of suffering during septicaemia analgesia cannot be applied. Instead, mostly animals will be euthanized when showing symptoms of septicaemia.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Sepsis will cause discomfort and expectedly a short period of severe suffering.

Explain why these effects may emerge.

Sepsis will cause a reduced blood flow and subsequent organ failure leading to death.

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

Next to the use of minimal size of treatment groups, animals are monitored 2-3 times a day. When symptoms of sepsis are observed a humane endpoint will be applied (see below).

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.

Animals are evaluated 5 times daily at the critical stage (until two days post-hatch) and then 3 times a day thereafter for 7 days post hatch (see table 1). Initially these observations will be made evenly distributed over 24 hours of a day, but shall be adapted to shorter intervals in anticipation of expected peak of mortality. Birds that received a clinical score of 2 will be euthanized by cervical dislocation. With this increased observation frequency in the beginning of the infection most animals with sepsis will be euthanized based on HEP.

Indicate the likely incidence.

It is expected that < 35 % of APEC infected animals will die from sepsis.

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').

A maximum of 35 % of animals per trial will experience severe discomfort caused by symptoms of sepsis, while the remaining and surviving animals experience mild discomfort.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

All remaining animals will be killed at the end of the animal phase at one week of age. Since animals have been infected with Avian Pathogenic *E. coli* there is no possibility for another housing outside the containment of animal experiment.

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	1	In ovo Immunostimulator Pilot

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.

Fertilized eggs will be infected by spraying egg surfaces with Avian Pathogenic *E. coli* (APEC). Since neonatal colibacillosis caused by APEC leads to acute mortality by septicaemia, mortality at and until one week after hatching will be the primary outcome parameter.

The main purpose of this experimental infection is to establish conditions for three different APEC strains with respect to available type of chicken breed that enables detection of at least 30% reduction of mortality by a preventive treatment with an immunostimulant (IS).

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

Fertilized eggs at three days (D18) before hatching (D21) will be sham-injected with a needle with 5% dextrose in water in the amnion cavity of the egg. At D19 eggs will be challenged by spraying egg surfaces with 10^7 CFU/egg of Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) through which eggs are infected via the punctured hole still present from Sham-injection at D18. Mortality at and until one week after hatching will be scored.

Three different APEC strains will be tested (treatment groups T2, T3 and T4 and compared with a control group T1. Every group will comprise of 80 animals (fertilized eggs).

To assess inter-experimental variation one repetition with one of the selected APEC strains (T1 and one from T2-4) will be needed. Total number of animals needed are 480, i.e. $4 (T_{1-4}) \times 80$ (Group size) + Repetition 2×80 .

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

When aiming for an improvement a more than 30% reduction of mortality should be observed in a subsequent challenge/treatment experiment. In a previous (US-)study this equalled to a reduction of >10% at hatch and >55% 7 days post-hatch [REDACTED]

[REDACTED] These conditions will primarily depend on the APEC strain, used for the experimental infection and need to cause an average mortality of 35% in untreated animals to practically enable the detection of effects by treatment. The minimal group size that enables statistical significant detection (with 80% statistical power) of this mortality rate is 80 animals. Statistical analysis will be carried out by using a two-proportion z-test.

B. The animals

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

Animal species: chicken. Preferred animal species because the host-specificity of the pathogen (APEC) and the relevant economic implications of the animal disease caused by APEC. Animal procedure will start with fertilized eggs purchased from a certified supplier. After hatching animals will kept for one week. Total number of animals for one experiment including one repetition is 480.

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.

Chicken is the target organism for (Avian Pathogenic Escherichia coli) APEC infections. Other animal species are not relevant. The hypothesized mode of action of the immunostimulant is to elicit an earlier and/or stronger induction of the innate immune response through binding of cell receptors of the immune system and subsequent activation of several pathways by signal transduction. Although some of these effects can be, and have been, tested in vitro before an in vivo testing even was considered, accurate predictions of protection against lethal APEC infections still cannot be made.

Number of animals per group have been reduced by using data from a previous trial [REDACTED] from 1600 to 300 which still allows for a statistical significant assessment of treatment effects.

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

Animals are kept on a bedding of wood shavings to stimulate foraging behaviour. Water and food is available immediate after hatching.

After hatching, chicks will be observed 5 or 3 times a day according to clinical score scheme (table 1) and humane endpoint decisions will be made. Initially these observations will be made evenly distributed over 24 hours of a day, but shall be adapted to shorter intervals in anticipation of expected peak of mortality. Mortality will be caused by sepsis and occurs very fast (usually within 3 hours). Sepsis will cause a short period of severe suffering, therefore observed symptoms of sepsis will lead to a humane endpoint decision. Animals will be euthanized by cervical dislocation.

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.

Although the animal procedure is based on a existing animal model, the use of different APEC strains, other type of chicken breed and other minor differences in the technical procedures necessitates the confirmation of the required mortality rate of about 35% to ensure that a subsequent challenge experiment will meet the required conditions.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

The major reason not to apply analgesia is the fact that this would compromise the aim of the study; e.g. it might interfere with the IS. Secondly, due to the short period of suffering during septicaemia analgesia cannot be applied. Instead, mostly animals will be euthanized when showing symptoms of septicaemia.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Sepsis will cause discomfort and expectedly a short period of severe suffering.

Explain why these effects may emerge.

Sepsis will cause a reduced blood flow and subsequent organ failure leading to death.

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

Next to the use of minimal size of treatment groups, animals are monitored 2-3 times a day. When symptoms of sepsis are observed a humane endpoint will be applied (see below).

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.

Animals are evaluated 5 times daily at the critical stage (until two days post-hatch) and then 3 times a day thereafter for 7 days post hatch (see table 1). Initially these observations will be made evenly distributed over 24 hours of a day, but shall be adapted to shorter intervals in anticipation of expected peak of mortality. Birds that received a clinical score of 2 will be euthanized by cervical dislocation. With this increased observation frequency in the beginning of the infection most animals with sepsis will be euthanized based on HEP.

Clinical score Colibacillosis neonatal chicken	
Score	Clinical observation
0	Normal
0,5	slightly abnormal-inactive appearance, slow to move
1	depressed, reluctant to move
1,5	reluctant to move, may take a drink and peck at feed occasionally
2	unable to stand or reach food or water
3	found dead
	HEP at ≥ 2
	Until 2 days post-hatching: 5 observations/day: individual animals
	After that 3 observations/day

Table 1. Clinical score scheme and HEP decision

Indicate the likely incidence.

It is expected that about 35 % of treated (APEC infected) animals will die from sepsis.

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').

Approximately 100 animals will experience severe discomfort caused by symptoms of sepsis, while the remaining and surviving animals experience mild discomfort.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

All remaining animals will be killed at the end of the animal phase at one week of age. Since animals have been infected with Avian Pathogenic *E. coli* there is no possibility for another housing outside the containment of animal experiment.

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

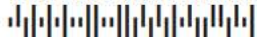


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stg DLO

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD401002016633

Bijlagen

2

Datum 2 november 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 28 oktober 2016. Het gaat om uw project "In ovo immune-stimulator". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD401002016633. 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: 40100
Naam instelling of organisatie: Stg DLO
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 908104
Straat en huisnummer: Akkermaaalsbos 12
Postbus: 59
Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN
IBAN: NL10RABO0397066465
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Wageningen UR

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Onderzoeker
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 november 2016
 Geplande einddatum: 1 november 2021
 Titel project: In ovo immune-stimulator
 Titel niet-technische samenvatting: Bescherming van pasgeboren kippen tegen sterfte door E. coll infecties
 Naam DEC: DEC-WUR
 Postadres DEC: [REDACTED] 6700 HB Wageningen
 E-mailadres DEC: dec@wur.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.187,-
 De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
 Functie: [REDACTED]
 Plaats: Wageningen
 Datum: 28 oktober 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag


Wageningen University & Research Concernstaf+
T.a.v. crediteurenadministratie
Droevendaalsesteeg 4
6708 PB WAGENINGEN


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002016633
Bijlagen
2

Datum 2 november 2016
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 2 november 2016
Vervaldatum: 2 december 2016
Factuurnummer: 16700633
Ordernummer: 

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD401002016633	€ 1.187,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 27 februari 2017 11:50
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: RE: Betreft behandeling van AVD401002016633: 'in ovo- immune stimulator'
Bijlagen: appendix-in ovo Immunostimulator_Challenge_27022017.docx; appendix-in ovo Immunostimulator_Pilot_27022017.docx

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Beste [REDACTED],
 Hierbij stuur ik u de gewijzigde versies door van de bijlagen betreffende AVD40100201663.
 Met vriendelijke groet,

From: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]

Sent: maandag 20 februari 2017 10:26

To: [REDACTED]

Cc: DEC WUR; IvD WR; [REDACTED]

Subject: RE: Betreft behandeling van AVD401002016633: 'in ovo- immune stimulator'

Geachte [REDACTED],

Uw aanvraag is besproken in de vergadering door de CCD. De CCD heeft besloten uw aanvraag te vergunnen, met de door u voorgestelde aanpassingen. Kunt u deze aanpassingen doorvoeren in de bijlagen dierproeven en een gewijzigde versie aan ons toesturen?

Zodra de gewijzigde versie ontvangen is zal ik u de beschikking en vergunning toesturen, de behandelingsperiode is tot die tijd opgeschort,

Vriendelijke groet, Diane Kegler

[REDACTED]
 Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
 Bezuidenhoutseweg 73 2594 AC Den Haag

Postbus 20401 2500 EK Den Haag

M O [REDACTED]

E [REDACTED]

Afwezig op vrijdag in de oneven weken

Van: [REDACTED]

Verzonden: dinsdag 7 februari 2017 11:22

Aan: 'info@zbo-ccd.nl'

CC: DEC WUR; IvD WR

Onderwerp: Betreft behandeling van AVD401002016633: 'in ovo- immune stimulator'

Aan CCD,

In antwoord op de hieronder verlangde aanvullingen op de projectvergunning AVD401002016633: 'in ovo- immune stimulator' het volgende:

De gevraagde aanvullingen betreffen twee onderwerpen. Een m.b.t. Vervanging en de ander m.b.t. Verfijning. In deze volgorde eerst de gestelde vragen en daarna de beantwoording.

Vervanging

Vraag:

Het betreft uw aanvraag AVD401002016633 getiteld: 'in ovo- immune stimulator'.

Het onderdeel Vervanging is te weinig beschreven, kunt u dit beter uitwerken.

Antwoord:

De immunostimulators die getest moeten worden zijn in feite in liposomen verpakte DNA moleculen. Deze DNA moleculen bevatten sequenties die na opname in immuuncellen van de gastheer worden gebonden door zogenaamd intracellulaire Toll-like receptors. Het gevolg hiervan is een activatie en cascade van signaalstoffen (cytokines) die het immuunsysteem aanzetten tot een antivirale en/of antibacteriële respons. Een aantal van dit soort signaalstoffen zijn met *in vitro*-testen te meten met gebruikmaking van geïsoleerde gastheercellen. Deze testen zijn voor de immunostimulators reeds gedaan, maar kunnen voor de uiteindelijke toepassing, een beschermend middel tegen infecties van

pathogene (zeer virulente) *E. coli* stammen, geen betrouwbare voorspelling doen over de effectiviteit. Ook is de pathologie van *in ovo* gestarte APEC infecties, met vaak snelle sterfte als gevolg, tot het moment van sepsis moeilijk te voorspellen op basis van klinische scores of andere parameters. Een tekstuele aanpassing van de dierproef-appendices wordt dan:

Huidige tekst:

Chicken is the target organism for APEC infections. Other animal species are not relevant. *In vitro* experiments for this infection and intervention studies with IS are not available. Number of animals per group have been reduced by using data from a previous trial () from 1600 to 300 which still allows for a statistical significant assessment of treatment effects.

Aangepaste tekst:

Chicken is the target organism for (Avian Pathogenic *Escherichia coli*) APEC infections. Other animal species are not relevant. The hypothesized mode of action of the immunostimulant is to elicit an earlier and/or stronger induction of the innate immune response through binding of cell receptors of the immune system and subsequent activation of several pathways by signal transduction. Although some of these effects can be, and have been, tested *in vitro* before an *in vivo* testing even was considered, accurate predictions of protection against lethal APEC infections still cannot be made. Number of animals per group have been reduced by using data from a previous trial () from 1600 to 300 which still allows for a statistical significant assessment of treatment effects.

Verfijning:

Vraag:

Voor wat betreft de gekozen Humane Eindpunten is tussen 2 en 3 weinig onderscheid. Omdat het door u gestelde criterium ?2 is, wordt niet voorkomen dat het Humane Eindpunt voor de dieren 'dood gevonden is', wat juist de bedoeling is van het stellen van humane eindpunten. Kunt u hier meer onderscheid maken, of het criterium anders stellen dan ?2?

Uit uw aanvraag wordt niet duidelijk op welke tijdstippen van de dag u de dieren gedurende de eerste 2 dagen na uitkomen monitort. Is dit alleen gedurende de dag, of ook 's nachts? Wanneer deze tijdsspanne kritisch is voor het bereiken van de HEP en om te voorkomen dat de dieren doodgaan als gevolg van sepsis, kunt u dan meer uitleggen hoe de gekozen tijdstippen bijdragen aan het voorkomen van het bereiken van het bereiken van HEP 3?

Antwoord:

Deze vraag was reeds eerder gesteld door de DEC en ook door mij beantwoord, maar deze beantwoording is helaas en abusievelijk toen niet in het DEC advies opgenomen. DEC ging overigens wel akkoord met de beantwoording die hieronder alsnog wordt weergegeven.

De frequentie van klinische observaties in de huidige dierproef bijlagen zijn gedurende de 2 dagen na uitkomst van eieren 3 keer per dag. Gebaseerd op ervaring is de verwachting namelijk dat de meeste mortaliteit in deze periode plaats zal vinden en dan zal pieken binnen een periode van ca. 8 uur. Verder gaat men er van uit dat wanneer een dier septicemie heeft (en dan een klinische score heeft van 2) het meestal binnen 3 uur zal sterven. De zorg van de DEC is dat men dan door de gehanteerde observatiefrequentie te veel dieren zal missen die toch in aanmerking hadden gekomen voor euthanasie ihkv HEP.

Hoewel dit niet in de beschrijving van de dierproef was opgenomen beoogde de opstellers met de frequentie van 3 x per dag de piek van verwachte sterfte te treffen en daar dan de volgende observaties op af te stemmen inclusief HEP.

De beschrijving van de criteria, met name de observatiefrequentie, voor HEP zal daarom worden aangepast.

Er zal tot en met twee dagen na uitkomst van het ei 5 x per dag worden geobserveerd. In beginsel zijn deze observatiemomenten gelijk verspreid over de 24 uur van een dag, maar deze kunnen worden aangepast naar tijdstippen korter op elkaar wanneer de verwachte mortaliteit daar aanleiding toe geeft. Na de tweede dag na uitkomst, zal er nog maar 3 x per dag worden geobserveerd.

Zoals staat beschreven in de projectbeschrijving zullen de bevindingen van het eerste *in ovo* infectie experiment worden gebruikt om het observatieschema en HEP te optimaliseren. Gewenste aanpassingen aan het protocol zullen dan middels amendementen worden voorgelegd aan de DEC/CCD.

Een tekstuele aanpassing van de dierproef-appendix zou dan worden:

Huidige tekst:

D. Replacement, reduction, refinement

Animals are kept on a bedding of wood shavings to stimulate foraging behaviour. Water and food is available immediate after hatching.

After hatching, chicks will be observed 2 or 3 times a day according to clinical score scheme (table 1) and humane endpoint decisions will be made. Mortality will be caused by sepsis and occurs very fast (usually within 3 hours). Sepsis will cause a short period of severe suffering, therefore observed

symptoms of sepsis will lead to a humane endpoint decision. Animals will be euthanized by cervical dislocation.

J. Humane endpoints

Animals are evaluated three times daily at the critical stage (until two days post-hatch) and then twice thereafter for 7 days post hatch (see table 1).). Birds that received a clinical score of 2 will be euthanized by cervical dislocation. With this increased observation frequency in the beginning of the infection most animals with sepsis will be euthanized based on HEP.

Clinical score Colibacillosis neonatal chicken	
Score	Clinical observation
0	Normal
0,5	slightly abnormal-inactive appearance, slow to move
1	depressed, reluctant to move
1,5	reluctant to move, may take a drink and peck at feed occasionally
2	unable to stand or reach food or water
3	found dead
	HEP at ≥ 2
	Until 2 days post-hatching: 3 observations/day: individual animals
	After that 2 observations/day

Aangepaste tekst:

D. Replacement, reduction, refinement

Animals are kept on a bedding of wood shavings to stimulate foraging behaviour. Water and food is available immediate after hatching.

After hatching, chicks will be observed 5 or 3 times a day according to clinical score scheme (table 1) and humane endpoint decisions will be made. **Initially these observations will be made evenly distributed over 24 hours of a day, but shall be adapted to shorter intervals in anticipation of expected peak of mortality.** Mortality will be caused by sepsis and occurs very fast (usually within 3 hours). Sepsis will cause a short period of severe suffering, therefore observed symptoms of sepsis will lead to a humane endpoint decision. Animals will be euthanized by cervical dislocation.

J. Humane endpoints

Animals are evaluated 5 times daily at the critical stage (until two days post-hatch) and then 3 times a day thereafter for 7 days post hatch (see table 1). **Initially these observations will be made evenly distributed over 24 hours of a day, but shall be adapted to shorter intervals in anticipation of expected peak of mortality.** Birds that received a clinical score of 2 will be euthanized by cervical dislocation. With this increased observation frequency in the beginning of the infection most animals with sepsis will be euthanized based on HEP.

Clinical score Colibacillosis neonatal chicken	
Score	Clinical observation
0	Normal
0,5	slightly abnormal-inactive appearance, slow to move
1	depressed, reluctant to move
1,5	reluctant to move, may take a drink and peck at feed occasionally
2	unable to stand or reach food or water
3	found dead
	HEP at ≥ 2
	Until 2 days post-hatching: 5 observations/day: individual animals
	After that 3 observations/day

Met vriendelijke groet,

██████████
 ████████████████████
 ██████████
 ████████████████████
 ████████████████████

[Redacted text block]

[Redacted text block]

Disclaimer:

This message together with the attachment(s), if any, are confidential and may be privileged. Unauthorised use, dissemination or publishing (in whole or in part) by third parties is not allowed. If you received this message by mistake, please delete the message including any attachments and notify the sender immediately. This email message does not create any contractual obligations.

[Redacted]

Van: Vergunningenloket <vergunningen@wur.nl>
Verzonden: woensdag 1 februari 2017 12:16
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: RE: vraag bij de behandeling van AVD401002016633

Categorieën: Dossier [Redacted]

Geachte mevrouw [Redacted]

Bedankt voor uw bericht met betrekking tot projectaanvraag 633g. De gevraagde informatie was inderdaad nog niet aangeleverd. Ik heb de betreffende onderzoeker hierop aangesproken. Hij verwacht in de loop van volgende week te zullen reageren.

Met vriendelijke groet,

[Redacted]

[Redacted]

Wageningen University & Research

[Redacted]

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: dinsdag 31 januari 2017 14:57
Aan: [Redacted]
CC: Vergunningenloket
Onderwerp: RE: vraag bij de behandeling van AVD401002016633

Geachte [Redacted]

Op 12 januari heeft de CCD u onderstaande vraag voorgelegd. Door storingsen in de mailbox kan het zijn dat wij uw antwoord niet ontvangen hebben. Zou u dit nogmaals in kunnen sturen of wanneer u nog niet heeft geantwoord dit willen doen?

Met vriendelijke groet, [Redacted]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl
.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 12 januari 2017 13:27
Aan: [Redacted]

CC: 'Vergunningenloket'

Onderwerp: vraag bij de behandeling van AVD401002016633

Geachte [REDACTED]

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend, deze aanvraag is in de vergadering van de CCD besproken. Omdat de CCD vergadering op 6 januari 2017 stond gepland en wij uw aanvraag op 2 januari 2017 compleet hebben ontvangen is de vraag eerst in de CCD vergadering besproken en zijn daar nog een aantal vragen uit naar voren gekomen waar de CCD van mening is dat de aanvraag nog aangevuld moet worden. Uw aanvraag hoeft niet nogmaals in de CCD vergadering besproken te worden, maar zal in een schriftelijke ronde worden afgehandeld.

Het betreft uw aanvraag AVD401002016633 getiteld: 'in ovo- immune stimulator'.

Het onderdeel Vervanging is te weinig beschreven, kunt u dit beter uitwerken. Voor wat betreft de gekozen Humane Eindpunten is tussen 2 en 3 weinig onderscheid. Omdat het door u gestelde criterium ≥ 2 is, wordt niet voorkomen dat het Humane Eindpunt voor de dieren 'dood gevonden is', wat juist de bedoeling is van het stellen van humane eindpunten. Kunt u hier meer onderscheid maken, of het criterium anders stellen dan ≥ 2 ?

Uit uw aanvraag wordt niet duidelijk op welke tijdstippen van de dag u de dieren gedurende de eerste 2 dagen na uitkomen monitort. Is dit alleen gedurende de dag, of ook 's nachts? Wanneer deze tijdsspanne kritisch is voor het bereiken van de HEP en om te voorkomen dat de dieren doodgaan als gevolg van sepsis, kunt u dan meer uitleggen hoe de gekozen tijdstippen bijdragen aan het voorkomen van het bereiken van het bereiken van HEP 3?

De behandeltijd van uw aanvraag is opgeschort totdat wij de aanvullingen hebben ontvangen, groeten [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)



Postbus 65 | 8200 AB Lelystad

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Wageningen
University & Research

DATUM
23 december 2016

ONDERWERP
aanvraag projectvergunning
AVD401002016633

OYS KENMERK
AVD401002016633

POSTADRES
[REDACTED]

BEZOEKADRES
[REDACTED]

INTERNET
www.wur.nl

KUK NUMMER
09098104

CONTACTPERSOON
[REDACTED]

TELEFOON
[REDACTED]

E-MAIL
DEC@wur.nl

Geachte CCD,

Onderstaand het advies dat de DEC-WUR heeft gegeven aangaande het project "In ovo immune-stimulator"

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD401002016633**
2. Titel van het project: In ovo immune-stimulator
3. Titel van de NTS: Bescherming van pasgeboren kippen tegen sterfte door *E. coli* infecties
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
DEC-WUR
[REDACTED]
Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 28-10-2016
Aanvraag compleet: 28-10-2016
In vergadering besproken: 21-11-2016
Termijnonderbreking(en) van 23-11-2016 tot 29-11-2016
Aanpassing aanvraag: 29-11-2016
Advies aan CCD: zie datum brief
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.

8. Correspondentie met de aanvrager

Datum vragen: 23-11-2016

Gestelde vragen en antwoorden:

- De DEC gaat ervan uit dat de gebruikte immunostimulatoren afbreekbaar zijn in het milieu. Kan de onderzoeker dit bevestigen? *Ja, want de immunostimulatoren die in dit project zullen worden getest en bedoeld zijn voor een toepassing in de voedselproductieketen zijn gebaseerd op immunostimulatoren die al in de praktijk worden gebruikt en waarvoor reeds vergunningen zijn verstrekt. Toxiciteit voor consument en milieu zijn voor deze vergunningen getoetst. De chemische variaties van de nieuwe te testen immunomodulanten zijn niet van dien aard dat een afwijkende toxiciteit te verwachten valt.*
- De DEC vraagt zich af hoe met 4 gemiddelde statistisch gerekend kan worden. *De statistische toetsen die gehanteerd gaan worden bij de evaluatie van de data (gemiddelden) zijn zogenaamde proportie-toetsen met een Z-verdeling (<http://stattrek.com/hypothesis-test/difference-in-proportions.aspx?Tutorial=AP>). Hiermee zal worden bepaald of de gevonden gemiddelden hoger, lager of gelijk zijn aan de controle groepen of een verwachte waarde (pilot)..*
- Er wordt toestemming gevraagd voor 6 experimenten. Wat gebeurt er wanneer na 3 experimenten blijkt dat er een goed middel is gevonden? Wordt dan nog experiment 4 t/m 6 uitgevoerd? Wat zijn de go/no-go's om een vervolgonderzoek uit te voeren? *Er zijn 6 nieuwe te testen immunostimulatoren ontwikkeld. Verwacht wordt dat hiertussen een immunostimulator zal zitten die voldoet aan de verwachting van het veroorzaken van ten minste 30% reductie in mortaliteit. Wanneer eerder dan het zesde geplande experiment een immunostimulant wordt gevonden met deze beoogde reductie, vervalt in principe de onderbouwing voor volgende testen uitsluitend op basis van het bereiken van deze gewenste reductie in mortaliteit, maar men verliest dan ook de mogelijkheid om een immunostimulant te vinden met een nog grotere reductie dan de daarvoor geteste. Deze mogelijkheid billijkt het aantal van zes te testen nieuwe immunostimulanten. Het zou immers een groot verschil kunnen uitmaken om verder te gaan met een immunostimulant die een reductie van 30% geeft of één die 50% reductie veroorzaakt.*
- De DEC wil weten hoe men komt tot ernstig ongerief bij 28% van de dieren? Verder wordt voor de overige dieren gesproken over mild ongerief. De DEC vraagt zich af of daar niet "iets" tussen in zit. Dit komt verder ook niet overeen met de 35% die onder J. genoemd staat. *De 35% sterfte door sepsis genoemd in J is het percentage dieren dat zonder behandeling verwacht wordt te sterven, en in die zin geen correct antwoord op de vraag. Dit percentage is gebaseerd op een eerder studie (US benchmark studie). Ondanks een vrij korte periode van ernstige ziekte (< 3 uur) is op grond van het (spontane) overlijden het ongerief als ernstig ingeschat. Met de verhoogde observatiefrequentie in het begin van de infectie zal men een groot deel van dieren met sepsis op basis van HEP euthanaseren. Een lager percentage van de dieren, geschat op 28%, ervaart, in beoogde experimenten met de verschillende immunostimulatoren, een ernstig ongerief. Hierbij is de verwachte reductie van sepsis door nieuwe immunostimulatoren meegenomen. Het genoemde percentage van 28% is een educated guess en wetenschappelijk slecht te onderbouwen. Het genoemde percentage zal daarom vervangen worden door < 35%. Het ongerief voor de dieren wordt voornamelijk bepaald door de acute fase van de sepsis. Wordt de infectie bedwongen of slaat de infectie niet aan dan zal het ongerief tijdens het experiment mild blijven.*
- De DEC wil weten of het mogelijk is om de HEP's beter invulling te geven. De DEC stelt voor om tijdens de periode dat sterfte verwacht wordt veel vaker dan nu aangegeven gecontroleerd wordt om zo in een eerder stadium dieren te euthanaseren. Is de onderzoeker geïnteresseerd in een betere bescherming of ook in een beter herstel van zieke dieren? In het laatste geval kan de DEC zich voorstellen dat HEP's niet eerder toegepast kunnen worden, maar

wanneer alleen gekeken wordt naar bescherming dan is het in de ogen van de DEC wel mogelijk om de HEP's al bij score 1 of 1,5. In dat geval kan in de ogen volstaan worden met matig ongerief en kan ernstig ongerief voorkomen worden.

Een uitgebreidere observatiefrequentie is bediscussieerd, maar verworpen, omdat wij verwachten met de voorgestelde observatiefrequentie en de HEP op basis van de klinische score ongerief vroegtijdig te detecteren en met een gewijzigd schema bij een individuele scoring geen verbetering te bereiken. Verder voorziet het geplande projectvoorstel in een evaluatie van de gehanteerde HEP beslissing en zal deze, wanneer daar aanleiding toe bestaat, aanpassen of optimaliseren. Op basis van de verwachte werkzaamheid van immunostimulatoren verwachten wij een combinatie van herstel en bescherming. Om die reden handhaven wij bij voorkeur een klinische score van ≥ 2 als reden tot HEP.

DATUM
23 december 2016

ONS KENMERK
AVD401002016633

PAGINA
3 van 5

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 de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. De DEC heeft geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort, signaleerd die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan.
3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van de aanvraag is: onderzoeken of een middel gebruikt kan worden om de weerbaarheid van kuikenembryo's te vergroten.
Het uiteindelijke doel van de aanvraag is het verhogen van de immuniteit en het verlagen van de mortaliteit van jonge kuikens om te komen tot een lager antibioticagebruik en een meer duurzame pluimveehouderij.
De DEC heeft vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen en dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belanghebbenden in het project en hun morele waarden zijn:
 - Proefdieren: aantasting van welzijn en integriteit
 - Doeldieren: robuustere kuikens met een beter welzijn door minder ziektegevoeligheid
 - Veehouder: economisch belang
 - Onderzoeker/CRO: economisch belang
 - Producent interventies: economische belang
 - Milieu/maatschappij: gezondheidsbelang als gevolg van minder antibioticagebruik
6. Een lager antibiotica-gebruik kan een milieu-effect hebben. De DEC kan niet inschatten of dit een substantieel effect zal zijn. De DEC gaat ervan uit dat de gebruikte immunostimulatoren afbreekbaar zijn in het milieu. De onderzoeker heeft dit desgevraagd bevestigd.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IvD, voldoende gewaarborgd zijn.
8. De DEC heeft vastgesteld dat, na verduidelijking door de onderzoeker, het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in de ogen van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "licht" en "ernstig" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit: sepsis-verschijnselen als gevolg van een *E. coli* besmetting.
12. Er is geen sprake van aantasting van integriteit anders dan die gepaard gaat met het uitvoeren van elke dierproef.
13. De DEC heeft, na verduidelijking van de onderzoeker, vastgesteld dat de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en dat goed in ingeschat welk percentage van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken.

3 V's

14. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. In een voortraject zal met dierproefvrije technieken al bepaald zijn welke interventies het meest kansrijk zijn.
15. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De DEC zien geen extra mogelijkheden voor verfijning, anders dan die de onderzoeker nu toepast.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De dieren worden van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven
19. De dieren worden wel gedood in het kader van het project. Omdat de dieren geïnfecteerd zijn met een aviaire pathogene *E. coli* is het niet mogelijk de dieren voor een volgend experiment te gebruiken of buiten de instelling te plaatsen. De dieren worden gedood volgens een passende methode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag van het project is: Kan het onderzoek naar de werkzaamheid en het gebruik van immunostimulators om kuikensterfte te verlagen het geringe, maar in een aantal gevallen ook mogelijk ernstig ongerief, voor de dieren rechtvaardigen.
2. De DEC heeft vastgesteld dat het gaat om een samenhangende aanvraag die als geheel toetsbaar is met een duidelijk omschreven doel. Gezien dit doel is de DEC van mening dat dit onderzoek niet zonder gebruik van dieren kan plaatsvinden. In haar afweging zijn de belangen zoals onder C5 vermeld staan gewogen. Hierbij is het belang van de doeldieren voorop gesteld en meegewogen dat een vermindering van het sterftepercentage van 2,8% weinig lijkt, maar dat dit in de praktijk enorme aantallen betreft. Het gaat hierbij om een duidelijk belang voor de dieren (leven en welzijn), maar ook om een reëel economisch belang. Verder is de DEC van mening dat de opzet van het project kan leiden tot het behalen van het directe doel en een bijdrage kan leveren aan het uiteindelijke doel. Op dit moment zit de DEC geen mogelijkheden dit project met aantoonbaar minder dieren uit te voeren of verder te verfijnen.
3. De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.

DATUM

23 december 2016

ONS KENNENDE

AVD401002016633

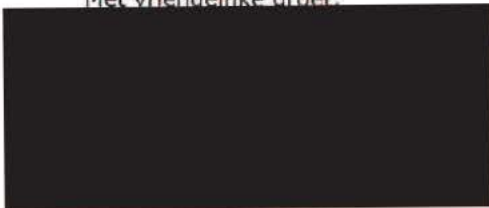
PAGINA

5 van 5

E. Advies

1. Advies aan de CCD:
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Onderstaande knelpunt is naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies:
 - De DEC is zich terdege bewust van de gevolgen die de huidige intensieve veehouderij met zich meebrengt en zij neemt dat mee in haar ethische afweging. De DEC is van mening dat het welzijn van de dieren in de intensieve veehouderij onder druk staat en dat onderzoek een bijdrage moet leveren aan het verbeteren van de leefomstandigheden van de dieren. De DEC heeft echter slechts zeer beperkte invloed op de wijze waarop dit ingevuld wordt. De DEC ziet geen directe verantwoordelijkheid voor zichzelf om te sturen op de keuze voor de strategie aangezien die al plaatsvindt voor de indiening van het project. Zij kan in dit kader enkel signaleren. Vanuit dit perspectief heeft de DEC dit project beoordeeld: gegeven de huidige omstandigheden is de DEC van mening dat het project een bijdrage levert aan het verbeteren van het welzijn (inclusief gezondheid) van de dieren. In de ogen van de DEC zijn de dierproeven niet gericht op een praktijk waarbij het welzijn van de dieren zodanig beïnvloed wordt dat dit intrinsiek tot schade aan de dieren leidt. De DEC ziet dit project juist als een stap naar mogelijke verbetering binnen de huidige veehouderij. De discussie over de wenselijkheid van die veehouderij-omstandigheden zal in een ander gremium dan de DEC gevoerd moeten worden.

Met vriendelijke groet,





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stg DLO

Postbus 59
6700 AB WAGENINGEN
|||

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002016633
Bijlagen
1

Datum 27 februari 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 28 oktober 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "In ovo immune-stimulator" met aanvraagnummer AVD401002016633. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 7 februari en 27 februari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Er is aan u gevraagd om de mogelijkheden voor Vervangen en Verfijnen meer uit te werken, met name de frequentie van controle voor tijdige toepassing van de Humane Eindpunten. U heeft op 7 februari 2017 de antwoorden toegezonden. Wij hebben u op 20 februari verzocht op basis van deze antwoorden de bijlage dierproeven aan te passen. U heeft op 27 februari 2017 de aangepaste bijlagen toegezonden.

Beslissing

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

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "In ovo immune-stimulator" starten. De vergunning wordt afgegeven van 28 februari 2017 tot en met 1 november 2021. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

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

een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Datum:
27 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD401002016633

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC-WUR. Dit advies is opgesteld op 23 december 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. De in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
27 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD401002016633



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stg DLO
Adres: Postbus 59
Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN
Deelnemersnummer: 40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 28 februari 2017 tot en met 1 november 2021, voor het project "In ovo immune-stimulator" met aanvraagnummer AVD401002016633, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-WUR.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 28 oktober 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 2 januari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 2 januari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 23 december 2016, ontvangen op 2 januari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 7 februari en 27 februari 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 In ovo Immunostimulator_Pilot				
	Kippen / kuikens vanaf 3 dagen voor uitkomst uit het ei, tot 7 dagen na uitkomst.	480	21% Ernstig 79% Licht	
3.4.4.2 In ovo Immunostimulator_Challenge				
	Kippen / kuikens vanaf 3 dagen voor uitkomst uit het ei, tot 7 dagen na uitkomst.	10.460	35% Ernstig 65% Licht	

Voorwaarden

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

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de

Aanvraagnummer:
AVD401002016633

wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk november 2022 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 de dierproeven conform de vergunning waren.

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

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 afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:
AVD401002016633

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Aanvraagnummer:

AVD401002016633

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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.