

Inventaris Wob-verzoek W17-18										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 2016731	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	Projectvoorstel			x						
3	Niet-technische samenvatting	x								
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x						
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x						
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x						
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4			x						
8	Bijlage beschrijving dierproeven 5			x						
9	DEC-advies				x		x	x		
10	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
11	Advies CCD		x						x	
12	Beschikking en vergunning				x		x	x		

09 NOV. 2016



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <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 22400 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																								
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1"> <tr> <td>Naam instelling of organisatie</td> <td colspan="2">Boehringer Ingelheim Animal Health Operations bv</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td colspan="2">[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>55530133</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>J.C. van Houtenlaan</td> <td>36</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td colspan="2">postbus 36 (1380AA Weesp)</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>1381CP</td> <td>Weesp</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td colspan="2">NL52DEUT0265175240</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td colspan="2">Boehringer Ingelheim AHO</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Boehringer Ingelheim Animal Health Operations bv		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]		KvK-nummer	55530133		Straat en huisnummer	J.C. van Houtenlaan	36	Postbus	postbus 36 (1380AA Weesp)		Postcode en plaats	1381CP	Weesp	IBAN	NL52DEUT0265175240		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Boehringer Ingelheim AHO	
Naam instelling of organisatie	Boehringer Ingelheim Animal Health Operations bv																									
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																									
KvK-nummer	55530133																									
Straat en huisnummer	J.C. van Houtenlaan	36																								
Postbus	postbus 36 (1380AA Weesp)																									
Postcode en plaats	1381CP	Weesp																								
IBAN	NL52DEUT0265175240																									
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Boehringer Ingelheim AHO																									
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>																									
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td colspan="2">Animal Investigations Group</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	Animal Investigations Group		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]										
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.																								
Functie	[REDACTED]																									
Afdeling	Animal Investigations Group																									
Telefoonnummer	[REDACTED]																									
E-mailadres	[REDACTED]																									
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td></td> <td><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres											
(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?
- Development of a vaccine against avian pathogenic E. Coli (APEC)
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Ontwikkeling van een vaccin tegen E.coli bij kippen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                           |
|-------------|---------------------------|
| Naam DEC    | DEC BIAHO                 |
| Postadres   | postbus 36 (1380AA Weesp) |
| E-mailadres |                           |

## 4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1727 Lege

Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  Via een eenmalige incasso

Na ontvangst van de factuur

*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

## 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

Weesp

Datum

28-04-2016

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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. **22400**
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. **BIAHO bv**
- 1.3 Provide the title of the project. **Development of a vaccine against avian pathogenic E. Coli (APEC)**

### 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.

[201609]

**Avian Pathogenic E. Coli (APEC) is a bacterium causing inflammations in multiple organs in**

chickens and has accounted for a large quantity of applied antibiotics in the field. Typically around 5-week old broilers and around 30-week old layers are affected. Although all organs may be affected through septicaemia of APEC, clinical signs of the respiratory apparatus stand on the foreground. Today many strains are multiresistant, due to applied antibiotics against this widespread disease. Especially flocks infected by Infectious Bronchitis-virus are susceptible to APEC infections. The use of a vaccine against APEC can improve animal welfare and production, as few antibiotics are effective. To date only one commercial APEC vaccine is available; therefore there are still opportunities in this market.

### 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 main objective is the development of a safe, effective vaccine against APEC with a genetically attenuated E coli strain, which is severely impaired in its replication metabolism. As this is an important virulence-factor, the attenuated strains are promising vaccine candidates. By following the stepwise strategy in selecting the candidates (see 3.4) it is ensured that the final candidates indeed provide safe yet effective immunity against APEC.**

### 3.3 Relevance

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

**APEC is a bacterium causing significant losses in production and increased death rates in both broilers and laying chicken flocks due to a range of inflammations, predominantly in the air sacs and lungs. As the use of antibiotics needs to be reduced to decrease antibiotic resistance, a vaccine is a valuable alternative asset in decreasing morbidity and mortality. At the same time this would improve animal welfare and prevent the associated economic loss caused by the decreased production, increased mortality and treatment costs.**

### 3.4 Research strategy

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

**The project is divided into 5 separate steps. In the first study, challenge models for the three most common virulent serotypes O1, O2 and O78 are developed by testing challenge candidates from these serotypes in multiple doses on non-vaccinated animals. In the second study the genetically attenuated vaccine candidates are evaluated by determining their persistence (amount of time they are detectable, an indication whether the vaccine candidate facilitates adequate time for an immune response to develop in the animal) and virulence. In the third study, the efficacy (protection against challenge) of the selected vaccine candidate(s) that is/were proven appropriate in the second study is/are tested. In the fourth study the minimum immunising dose (MID) of these vaccine candidate(s) is/are determined, and in the fifth study the extent of cross-immunity they provide is tested.**

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.

**In the first study, groups of non-vaccinated chickens will be infected with different APEC strains (from each of the 3 serotypes) in different doses to determine a sufficient challenge dose. In the second study, chickens will be vaccinated with different vaccine candidates, and the residual pathogenicity (virulence) and persistence will be evaluated. In the third study, chickens will be vaccinated with the remaining vaccine candidates and will be challenged thereafter to evaluate efficacy. In the fourth study, groups of chickens will be vaccinated with different vaccination doses, to determine the MID. In the fifth and final study of the project animals will be vaccinated and challenged with the selected 3 different challenge strains (one for each serotype), to determine the extent of cross-immunity.**

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.

**The developed challenge models in the first study are used to test the efficacy of the vaccine candidates. The candidates are selected based on the results from the second study (those with no residual virulence). Only the vaccines that are efficacious (study 3) will be enrolled for the MID finding and cross-immunity studies. If, in study 201609.2, only 1 or 2 vaccines are selected, the testing for efficacy and the MID (studies 201609.3 and 201609.4) will be combined.**

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	<b>201609.1 Development of challenge models for 3 APEC serotypes</b>
2	<b>201609.2 Virulence and persistence of 2 wildtype and 6 modified APEC strains to be used in vaccine formulation</b>
3	<b>201609.3 Efficacy of vaccine candidates against APEC infections compared to a commercially available vaccine</b>
4	<b>201609.4 Minimum immunising dose finding study for vaccine candidates against APEC</b>
5	<b>201609.5 Evaluation of the cross-protection of candidate APEC-vaccines using the minimum immunising dose</b>
6	
7	
8	
9	
10	



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	<b>22400</b>				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	<b>BIAHO bv</b>				
1.3	List the serial number and type of animal procedure.  <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	<table><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td><b>3.4.4.1</b></td><td><b>201609.1 Development of challenge models for 3 APEC serotypes</b></td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	<b>3.4.4.1</b>	<b>201609.1 Development of challenge models for 3 APEC serotypes</b>
Serial number	Type of animal procedure					
<b>3.4.4.1</b>	<b>201609.1 Development of challenge models for 3 APEC serotypes</b>					

#### 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.

##### [201609.1 Development of challenge models for 3 APEC serotypes]

**Avian Pathogenic E. Coli (APEC) is a bacterium causing a wide spectrum of inflammations in chickens, making it a major problem for which antibiotics are applied. To prevent the use of large quantities of antibiotics, vaccines against APEC are desired. To be able to test the efficacy of vaccine candidates, a challenge model which can reliably represent field disease conditions is needed. The objective of this study is to select E. Coli strains of the most common serotypes (O1, O2 and O78) that are capable of inducing clinical or in necropsy visible colibacillosis in non-vaccinated chickens, making them suitable to be used in a challenge model. Also the required challenge doses are determined.**

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

**Maximally 6 E. coli challenge strains (from all 3 serotypes) will be tested in 3 doses ( $10^8$ ,  $10^9$  and  $10^{10}$  cfu), leading to 18 groups. Two time points will be investigated, meaning that maximally 36x16 animals will be used. Sixteen animals per time point (and 32 animals per group) results from the statistical considerations as detailed in the next section. Therefore, maximally 576 animals are used. The animals will be 35 days (5 weeks) old when they are challenged intra-tracheally with the challenge dose (procedure according to Antao et al., 2008, The chicken as a natural model for extraintestinal infection caused by avian pathogenic Escherichia coli (APEC)). 24 hours post-challenge, 16 animals per group will be euthanized and necropsied. 48 hours post-challenge, the remaining 16 per group will be euthanized and**



necropsied. In the study of Antao et al. it was found that the lesions caused by E. coli after 48 hours are less than those found at 24 hours; yet this varies between strains and is not exactly known for the candidate challenge strains. Therefore the effects of the strains must also be assessed at 48h post-challenge. All animals will receive a clinical score based on disease symptoms (ordinal scale, described by Antao et al, 2008). The internal organs will each be given a score (ordinal scale) according to the system as also described by Antao et al. 2008. Depending on the results of the clinical and necropsy scores, additional tissue samples of the organs may be taken to determine whether the challenge bacterium can be re-isolated. The goal is to create a challenge model generating morbidity in 50% of non-vaccinated animals.

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

In the given reference (Antao et al, 2008), a significant difference in mean organ lesion score between a pathogenic and non-pathogenic E. coli strain was found using 20 animals per group (15 sacrificed 24 hours post-challenge, and 5 animals 48 hours post-challenge). The average lesion score of the animals treated with the pathogenic strain was 7,5 ( $\mu$ ); the standard deviation was 2,2( $\sigma$ ). In our study, we wanted to be able to detect a difference of at least 2,5 between average lesion scores ( $\delta$ ). The significance level  $\alpha$  was set on 0,05; the power ( $1-\beta$ ) was set on 80%. The standardized difference then becomes  $2,5/2,2=1,14$ . Given these values, a power analysis based on a t-test as used in Antao indicates a sample size of 14 to be adequate (see, for example, <http://biomath.info/power/ttest.htm>). Since the Antao score is not a continuous variable but yields a range of integer values, a non-parametric test such as a Mann-Whitney or Wilcoxon test is preferable; for these tests, a sample size of 14 is still adequate. It was decided that 16 animals per time point, per group will be included. Maximally 10 animals can be housed in 1 isolator, and groups of 8 give an equal distribution over two isolators. This optimizes the odds of finding significant results while minimally wasting isolator capacity and simultaneously minimizing animal numbers. Therefore, per group maximally 32 animals are used.

16 animals per challenge strain will initially be tested (8 at 24 hours, 8 at 48 hours). If there are no effects of the challenge, that strain is eliminated from further testing. Those strains that do give an effect are tested again with 2 more groups of 8 (again 8 at 24 hours, 8 at 48 hours). This way, there is no unnecessary animal use on non-suitable strains. At the same time the suitable strains are tested with the calculated number of animals (32 per strain, 16 per time point).

#### B. The animals

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

**Maximally 576 SPF animals of 35 days old will be used in the study to ensure their immunocompetency yet APEC susceptibility. Chickens are the best model to be used as they are the target species for the vaccine. SPF birds are not vaccinated or treated against E. coli, eliminating the risk that the study is influenced by maternally derived immunity in the animals. The project is a proof of concept study, for which a reproducible model is desired. Once this model is established, it will later be adapted to the target animal (commercial broilers).**

#### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

#### **D. Replacement, reduction, refinement**

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

**The in-vivo chicken model is most suitable for investigating the challenge model, as the chicken is the target species. The interaction between the challenge, the immune system and other organ systems is vital to obtain a reliable challenge model; therefore replacement by an in vitro model is not possible.**

**Once a suitable E. coli challenge strain for a serotype is found, other candidates of the same serotype will not be tested. The number of animals is based on the average and standard deviation found in the study of Antao et al., 2008, which found significant results using 20 animals per group, sacrificing 15 animals 24 hours after challenge and 5 animals 48 hours after challenge. As only the 24-hour statistic was significant, the minimal group size was calculated through a power analysis using the results found in this 24h group.**

**Because standardized animals are used and these are housed in a controlled environment, a negative control group is not enrolled.**

**Refinement is achieved by selection of the infection model. This is based on a short observation time, focusing on the effects of septicaemia (visible through laboratory analysis and necropsy) and not waiting for severe clinical symptoms. Frequent observation (described below) during the observation periods of 24 and 48 hours ensures timely application of a humane endpoint where required. The animals are handled by experienced animal technicians, ensuring that stress is minimized.**

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

**Animals exhibiting severe clinical signs, including:**

- **the production of serous exudate upon breathing;**
- **heavy breathing for over 6 hours;**
- **or other signs of severe illness or severe discomfort as noted by the animal technician or veterinarian,**

**which lead to unnecessary suffering as physiological behaviour is impaired, will be euthanized as the humane end point has been reached.**

**All animals will be inspected clinically every 6 hours, starting 12 hours after challenge (no signs are expected before this point) to obtain the most accurate clinical scores and humane end points. Care will be given by experienced animal technicians. The same experienced animal technicians will handle the animals and do all administrations, ensuring that stress is kept to a minimum.**

**The animals are housed in isolators to prevent adverse effects due to pathogen spreading.**

### **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.

**E. coli strains from recent field cases will be used for the development of the challenge models to ensure that an up to date vaccine profile and challenge are developed.**

### **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.

**To determine the most accurate clinical score and reliable organ bacterial counts, the animals must exhibit the natural clinical symptoms. Therefore the use of anaesthesia or analgesia will interfere with the study. If, however, it appears that the chickens experience severe discomfort during the intra-tracheal challenge procedure, outweighing the effects of anaesthesia, the animals will be anaesthetized by inhalation during the challenge procedure. To minimize suffering, the animals will be euthanized as soon as the humane end point is reached.**

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?

**Stress due to handling and identification measures, stress due to challenge administration.**

Explain why these effects may emerge.

**Fixation to place identification wing-tags; fixation for intra-tracheal challenge administration; intra-tracheal administration.**

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

**The animals will be observed every 6 hours, from 12 hours after challenge and onwards (as before this no effects are expected) to ensure accurate clinical scores and a precise humane end point determination. All observations are noted in the study report. Handling, fixation and administration will be done by experienced animal technicians who ensure the least stress for the animal as possible. If necessary, the intra-tracheal inoculation occurs under inhalation anaesthesia.**

### 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 exhibiting severe clinical signs, including:**

- **the production of serous exudate upon breathing;**

- heavy breathing/severe respiratory distress lasting 6 hours;
- or other signs of severe illness or severe discomfort as noted by the animal technician or veterinarian,

which lead to unnecessary suffering as physiological behaviour is impaired, will be euthanized as the humane endpoint has been reached.

All animals will be inspected clinically every 6 hours (starting 12 hours post-challenge) to obtain the most accurate clinical scores and humane end points.

Indicate the likely incidence.

**50% of 576 animals = 288 animals**

It is expected that the groups receiving the highest doses will suffer the most severe clinical symptoms, as the E. coli infection will generate a systemic illness through septicaemia. Therefore these animals are most expected groups to reach a humane endpoint before termination of the study. The other groups may display clinical symptoms, yet morbidity will be relatively less (10-30%). On average, severe illness/discomfort may be expected in 50% of the animals.

#### **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').

**Severe 288 animals. This is the average expected discomfort of the groups receiving the highest challenge doses and the animals reacting on the lower doses. It is based on the worst case scenario (developing clinical illness of the highest category, 4, as described by Antao et al.).**

**Moderate 288 animals. As described by Antao et al (2008), lower doses may also give clinical symptoms, yet this will be to less animals and the symptoms are mostly restricted to the respiratory apparatus, giving lower clinical scores (up to category 2).**

### **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.

**To obtain lesion scores for the organs and the bacterial content, necropsy must be performed.**

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	<b>22400</b>	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	<b>BIAHO bv</b>	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.  <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number  <b>3.4.4.2</b>	Type of animal procedure  <b>201609.2 Virulence and persistence of 2 wildtype and 6 modified APEC strains to be used in vaccine formulation</b>

#### 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.

##### **[201609.2 Virulence and persistence of 2 wildtype and 6 modified APEC strains to be used in vaccine formulation]**

**Avian Pathogenic E. Coli (APEC) is a bacterium causing a wide spectrum of inflammations in chickens, making it a major problem for which antibiotics are applied. To prevent the use of large quantities of antibiotics, vaccines against APEC are desired. To be able to test the efficacy of vaccine candidates, a challenge model is needed, which will be developed in another study in this project (201609.1). The objective of this study is to select from a panel of 6 modified E. Coli strains the most suitable vaccine candidates based on organ lesions induced in the vaccinated animals. The panel of modified E. coli strains have been attenuated using recombination technology severely affecting replication, and are expected to induce few or mild lesions in comparison to wildtype strains.**

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

**6 recombinant strains will be tested; 3 recombinants derived from wildtype strain 51 (wt51), and 3 recombinants derived from wildtype strain 52 (wt52). All belong to the serotype O78. The level of attenuation will be measured by comparing the recombinant strains with their corresponding wildtype strain, which are expected to give lesions that are visible on necropsy. The chickens will be vaccinated by coarse spray as day-old chicks, corresponding to the**

vaccination scheme of the available commercial vaccine.

On 6 consecutive time points, 3 animals from each group will be euthanized and necropsied to evaluate the vaccine lesion effects (virulence) and bacterial count in the internal organs (persistence). 6 time-points are evaluated as it is unknown for how long colonisation by the vaccine candidates will last. 3 of the time-points are located in the first week, as the initial colonisation period is the most important and therefore requires more information. The scoring protocol is based on Antao et al, 2008 (The chicken as a natural model for extraintestinal infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli*).

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

**18 animals are included for each APEC strain. It provides a sufficient number of animals to view multiple time-points, yet is the minimum to be able to compare individuals at each time-point even if some animals are lost during the course of the study due to reasons unrelated to colibacillosis (3 animals for each time-point; compare whether there are lesions at necropsy and whether APEC bacteria can be re-isolated).**

#### B. The animals

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

**8 groups of 18 (total 144), day-old SPF chicks will be vaccinated by coarse spray (study day 0), with an approximate droplet size of 100 µm and a dose per animal of approximately 9,1x10<sup>9</sup> cfu (the upper limit of the range registered for the available commercial vaccine). On days 2, 4, 7, 14, 21 and 28, 3 animals from each group will be euthanized and necropsied to assess the virulence (by gross lesions) and persistence (through re-isolation of the APEC in tissue samples) of the vaccine in the course of time. On day 28 the last 3 birds of each group are therefore euthanized and necropsied, ending the study. The procedure is summarized in the table below.**

**SD: study day; wt: wild type; RC: recombinant; n: number of animals**

Group	n	SD0	SD2	SD4	SD7	SD14	SD21	SD28
1: wt51	18	Vacc by spray	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds
2: wt52	18	Vacc by spray	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds
3:wt51 RC1	18	Vacc by spray	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds
4: wt51 RC2	18	Vacc by spray	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds
5: wt51 RC3	18	Vacc by spray	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds
6: wt52 RC1	18	Vacc by spray	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds
7: wt52 RC2	18	Vacc by spray	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds
8: wt52 RC3	18	Vacc by spray	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds	Necropsy 3 birds

#### 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.

**As the chicken is the target animal species, it is also the best model in this study. As the aim is to measure the effect of the vaccine on the animal itself, no replacement of the in-vivo model is possible. Vaccine candidates displaying high residual virulence will not be investigated further (study is a decision point). The minimum number of animals that is necessary is used. Using 18 animals per group provides a sufficient number of animals to view multiple time-points, yet is the minimum to be able to compare individuals at each time-point even if some animals are lost during the course of the study due to reasons unrelated to colibacillosis.**

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

**Animals exhibiting severe clinical signs of illness or discomfort which leads to impaired physiological behaviour and/or the inability to maintain homeostasis will be euthanized, as the humane endpoint has therefore been reached. All animals will be inspected every 6 hours to ensure that clinical signs are not missed and therefore the humane endpoint is accurately set and the animal is euthanized timely, preventing unnecessary suffering. All animals are handled by experienced animal technicians, ensuring that stress is minimized.**

### **Repetition and duplication**

#### **E. Repetition**

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

**The tested vaccine candidates were developed recently and have not yet been tested.**

### **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.

**To accurately determine the residual virulent effect of the vaccine candidates and their persistence, the immune system must not be iatrogenically influenced. Therefore, no analgesics will be used as this will interfere with the study results.**

**The animals will be clinically inspected every 6 hours to ensure accurate determination of the humane endpoint and timely euthanasia.**

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?

**Stress due to handling and identification measures; stress due to vaccine administration.**

Explain why these effects may emerge.

**Fixation to place identification wing-tags; vaccination by spray.**

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

**All fixation and administration procedures will be performed by experienced animal technicians, ensuring fast and accurate administration minimizing stress for the animals.**

### 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 exhibiting severe clinical signs of illness or discomfort which leads to impaired physiological behaviour and/or the inability to maintain homeostasis will be euthanized, as the humane endpoint has therefore been reached. Respiratory signs or circulatory defects may be possible due to colibacillosis vaccination with high residual virulence. In general, severe respiratory distress lasting 6 hours is considered a humane endpoint. All animals will be inspected every six hours to ensure that clinical signs are not missed and therefore the humane endpoint is accurately set and the animal is euthanized timely, preventing unnecessary suffering.**

Indicate the likely incidence.

**25% - Two groups of 18 birds (total 36/144 → 25%) receive the wildtype strains, which are not attenuated. The strains are, however, administered by coarse spray, meaning that the wildtype strains are unlikely taken up in the chicken's respiratory system in the concentrations required to cause clinical disease. The lesions are expected to only be visible during necropsy.**

### 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').

**As the degree of attenuation of the vaccine candidates is not known, the expected level of discomfort is therefore considered as moderate for 75% of the animals, and as severe for 25% of the animals (assuming the worst case scenario that the attenuated strains still cause mild clinical disease and the wildtype bacteria, which have no attenuation, cause moderate or severe clinical disease).**

## 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.

**To determine the extent of the vaccine virulence, all organs must be assessed for gross lesions. Samples from the organs are used to determine the persistence of the vaccine.**

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	<b>24400</b>	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	<b>BIAHO bv</b>	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.  <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
		<b>3.4.4.3</b>	<b>201609.3 Efficacy of vaccine candidates against APEC infections compared to a commercially available vaccine</b>

#### 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.

##### **[201609.3 Efficacy of vaccine candidates against APEC infections compared to a commercially available vaccine]**

**Avian Pathogenic E. Coli (APEC) is a bacterium causing a wide spectrum of inflammations in chickens, making it a major problem for which antibiotics are applied. To prevent the use of large quantities of antibiotics, vaccines against APEC are desired. To be able to test the efficacy of vaccine candidates, a challenge model is developed in the first study in this project and suitable vaccine candidates are selected in the second study. In this third study the efficacy of the selected vaccine candidates will be tested with a homologue challenge and compared to the only available commercial APEC vaccine. Efficacy will be based on clinical and necropsy evaluation and organ bacterial count as described by Antao et al, 2008, The Chicken As a Natural Model for Extraintestinal Infections Caused by Avian Pathogenic E coli (APEC).**

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

**A maximum of four vaccine candidates will be tested for efficacy. For this purpose the chickens will be vaccinated as day-old chicks (study day (SD) 0) by coarse spray, with an approximate droplet size of 100 µm and a dose per animal around the lower limit of the dose range registered for the available commercial vaccine. The animals will all be challenged with the homologous challenge strain of the commercial and candidate vaccines (serotype O78) on**

day 35 (5 weeks of age) according to the challenge model developed in 201609.1. To assess the correct application of the challenge, a positive control group (receiving only the challenge on day 35) is also enrolled in this study. To compare the vaccine candidates with the commercially available vaccine, a group that is vaccinated with the available commercial vaccine and subsequently challenged is also enrolled. The animals will be observed for 24 or 48 hours and then euthanized and necropsied. The choice for 24 or 48 hours post-challenge depends on the results of 201609.1: if the challenge is hard to detect at 48 hours post-challenge, the end of study time is put at 24 hours post-challenge.

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

In the given reference (Antao et al, 2008), a significant difference in mean organ lesion score between a pathogenic and non-pathogenic E coli strain was found using 20 animals per group (15 sacrificed 24 hours post-challenge and 5 animals 48 hours post-challenge). The average lesion score of the animals treated with the pathogenic strain was 7,5 ( $\mu$ ); the standard deviation was 2,2( $\sigma$ ). In our study, we wanted to be able to detect a difference of at least 2,5 between average lesion scores ( $\delta$ ). The significance level  $\alpha$  was set on 0,05; the power (1- $\beta$ ) was set on 80%. The standardized difference then becomes  $2,5/2,2=1,14$ . Given these values, a power analysis based on a t-test as used in Antao indicates a sample size of 14 to be adequate (see, for example, <http://biomath.info/power/ttest.htm>). Since the Antao score is not a continuous variable but yields a range of integer values, a non-parametric test such as a Mann-Whitney or Wilcoxon test is preferable; for these tests, a sample size of 14 is still adequate. It was decided that 16 animals per group will be included. Maximally 10 animals can be housed in 1 isolator, and groups of 8 give an equal distribution over two isolators. This optimizes the odds of finding a significant result, while minimally wasting isolator capacity and simultaneously minimizing animal numbers.

#### B. The animals

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

A maximum of 96 SPF chickens will be used for this study. 80 will be vaccinated as day-old chicks; 16 of these will receive the commercially available vaccine, another 16 will be vaccinated with the first vaccine candidate, 16 more will be vaccinated with the second vaccine candidate, another 16 with the third candidate and 16 with the fourth candidate. The number of vaccinated groups depends on the number of vaccines selected in study 201609.2. The last 16 animals will be the positive control group, to confirm that an adequate challenge was given. The positive control group can be reduced to 10 animals, depending on the robustness (the size of the dose/effect relationship) of the challenge model developed in study 201609.1. The goal of the challenge is to achieve 50% morbidity by challenge in non-vaccinated animals. All animals (vaccinated and positive control) are challenged intra-tracheally at 35 days of age with a challenge dose that will be determined in study 201609.1. Efficacy will be evaluated by comparing morbidity between the vaccine groups (the candidates and the commercially available vaccine).

#### 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.

**Because the chicken is the target species, these are best used as the study model. Testing the efficacy of a vaccine can only be done in vivo. The required number of animals was calculated using a power calculation (see section A).**

**If only 1 or 2 vaccines candidates are selected in study 201609.2, the efficacy and minimum immunising dose (MID) finding study (201609.4) are put together in 1 study, to reduce the number of animals (only 1 positive control group needed). Testing more vaccine candidates for both efficacy and MID in one study is not wanted as the risk becomes too great that non-efficacious vaccine candidates are tested for the MID (leading to unnecessary animal and resource use). If 3 or 4 vaccine candidates are selected in study 201609.2, a selection through the efficacy test must be done first. All animal handling and vaccine and challenge administrations are performed by experienced animal technicians, minimizing stress and discomfort for the animals.**

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

**Animals exhibiting severe clinical signs of illness or discomfort which leads to impaired physiological behaviour and/or the inability to maintain homeostasis will be euthanized, as the humane endpoint has therefore been reached. All animals will be inspected every 6 hours to ensure that clinical signs are not missed and therefore the humane endpoint is accurately set and the animal is euthanized timely, preventing unnecessary suffering. To reduce environmental effects, the animals are housed in isolators with HEPA filters.**

**The standard procedure for intra-tracheal inoculation is swift, and it appears that the effects of anaesthetizing the animal do not outweigh the limited stress of the procedure. If, however, the circumstances become unfavourable towards the animal's welfare, it will be decided to put the animal under inhalation anaesthesia during intra-tracheal inoculation.**

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

**The investigated vaccine candidates have been newly developed and have not yet been tested for efficacy.**

## 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.

**Applying analgesia will interfere with the immune reaction of the animals and therefore cannot be applied without interfering with the study results. The animals will be clinically inspected every six hours to ensure timely application of the humane endpoint. The standard procedure for intra-tracheal inoculation is swift, and it appears that the effects anaesthetizing the animal do not outweigh the limited stress of the procedure. If, however, the circumstances become unfavourable towards the animal's welfare, it will be decided to put the animal under inhalation anaesthesia during intra-tracheal inoculation.**

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?

**Stress due to handling and identification measures; stress due to vaccine administration; stress due to challenge administration.**

Explain why these effects may emerge.

**Fixation to place wing tag identification; vaccination by spray; intra-tracheal challenge; fixation for intra-tracheal challenge.**

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

**All fixation and administration procedures will be performed by experienced animal technicians, ensuring fast and accurate administration minimizing stress for the animals. Animals exhibiting severe clinical signs of illness or discomfort which leads to impaired physiological behaviour and/or the inability to maintain homeostasis will be euthanized, as the humane endpoint has therefore been reached. All animals will be inspected every 6 hours to ensure that clinical signs are not missed and therefore the humane endpoint is accurately set and the animal is euthanized timely, preventing unnecessary suffering. Inhalation anaesthesia will be applied in case unforeseen circumstances make the intra-tracheal inoculation welfare-compromising.**

### 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 exhibiting severe clinical signs, including:**

- **the production of serous exudate upon breathing;**
- **heavy breathing/severe respiratory distress lasting 6 hours;**
- **or other signs of severe illness or severe discomfort as noted by the animal technician or veterinarian,**

**which lead to unnecessary suffering as physiological behaviour is impaired, will be euthanized as the humane end point has been reached.**

**All animals will be inspected clinically every six hours to obtain the most accurate clinical scores and humane end points.**

Indicate the likely incidence.

**These severe effects are only expected for the positive control group = 16 of 96 animals**

**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').

**16/96 animals (17%): severe discomfort (the positive control group, receiving only challenge)**

**80/96 animals (83%): moderate discomfort (the animals receiving a vaccination prior to challenge)**

**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.

**To confirm that also the animals that did not display clinical symptoms are not affected by the vaccine or challenge, necropsy must be performed on all animals.**

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	<b>22400</b>	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	<b>BIAHO bv</b>	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.  <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number <b>3.4.4.4</b>	Type of animal procedure <b>201609.4 Minimum immunising dose finding study for vaccine candidates against APEC</b>

#### 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.

**[201609.4 Minimum immunising dose finding study for vaccine candidates against APEC] Avian Pathogenic E. Coli (APEC) is a bacterium causing a wide spectrum of inflammations in chickens, making it a major problem for which antibiotics are applied. To prevent the use of large quantities of antibiotics and diminish APEC antibiotic resistance, vaccines against APEC are desired. In the project challenge models, virulence and persistence and efficacy of the vaccine candidates are tested. This study continues with investigating the minimum immunising doses (MID) of the selected vaccine candidate strains.**

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

**A maximum of two candidate vaccine strains will be tested for the MID. SPF chickens will be vaccinated as day-old chicks; each group of 14 animals will receive a different dose of a candidate vaccine. 4 doses are tested:  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  and  $10^9$  cfu per bird. Alongside the vaccinated animals a positive control group (to validate the challenge) will be enrolled. Challenge will be performed intra-tracheally at 5 weeks according to the challenge model developed in 201609.1. The birds will be observed for 24 or 48 hours for onset of disease and/or general performance. The time-point of euthanasia will depend on the developed challenge model – if lesions do not manifest themselves at 48 hours in study 201609.1, the birds will be euthanized and necropsied at 24 hours post-challenge. All animals will be given a clinical score, and at necropsy the organs are scored as described in Antao et al, 2008 ( The chicken as a natural model for extraintestinal infections caused by avian pathogenic**

**Escherichia coli (APEC)) to evaluate the effect of vaccination and challenge per dose. Depending on the results of the clinical and necropsy scores, additional tissue samples of the organs may be taken to determine whether the challenge bacterium can be re-isolated.**

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

**In the given reference (Antao et al, 2008), a significant difference in mean organ lesion score between a pathogenic and non-pathogenic E. coli strain was found using 20 animals per group (15 sacrificed 24 hours post-challenge and 5 animals 48 hours post-challenge). The average lesion score of the animals treated with the pathogenic strain was 7,5 ( $\mu$ ); the standard deviation was 2,2( $\sigma$ ). In our study, we wanted to be able to detect a difference of at least 2,5 between average lesion scores ( $\delta$ ). The significance level  $\alpha$  was set on 0,05; the power (1- $\beta$ ) was set on 80%. The standardized difference then becomes  $2,5/2,2=1,14$ . Given these values, a power analysis based on a t-test as used in Antao indicates a sample size of 14 to be adequate (see, for example, <http://biomath.info/power/ttest.htm>). Since the Antao score is not a continuous variable but yields a range of integer values, a non-parametric test such as a Mann-Whitney or Wilcoxon test is preferable; for these tests, a sample size of 14 is still adequate. It was decided that 16 animals per group will be included. Maximally 10 animals can be housed in 1 isolator, and groups of 8 give an equal distribution over two isolators. This optimizes the odds of finding a significant result, while minimally wasting isolator capacity and simultaneously minimizing animal numbers.**

**4 candidate vaccine doses are tested to be able to create a clear dose-response curve. Both candidates are tested at the same time, so only 1 positive control group is required.**

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

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

**A maximum of 144 SPF chickens will be used. 128 will be vaccinated by spray as day-old chicks (day 0). On day 35 (5 weeks) all 144 animals (the vaccinated and positive control chickens) are intra-tracheally challenged according to the developed challenge model of study 201609.1. After 24 or 48 hours (depending on the results of 201609.1) of observation all animals are necropsied to evaluate efficacy.**

<b>Group</b>	<b>N</b>	<b>Vaccination</b>	<b>Challenge</b>
<b>1: challenge control/positive control</b>	<b>16</b>	<b>NA</b>	<b>Day 35</b>
<b>2: Vaccine 1, 10<sup>6</sup> cfu</b>	<b>16</b>	<b>Day 0, coarse spray</b>	<b>Day 35</b>
<b>3: Vaccine 1, 10<sup>7</sup> cfu</b>	<b>16</b>	<b>Day 0, coarse spray</b>	<b>Day 35</b>
<b>4: Vaccine 1, 10<sup>8</sup> cfu</b>	<b>16</b>	<b>Day 0, coarse spray</b>	<b>Day 35</b>
<b>5: Vaccine 1, 10<sup>9</sup> cfu</b>	<b>16</b>	<b>Day 0, coarse spray</b>	<b>Day 35</b>
<b>6: Vaccine 2, 10<sup>6</sup> cfu</b>	<b>16</b>	<b>Day 0, coarse spray</b>	<b>Day 35</b>
<b>7: Vaccine 2, 10<sup>7</sup> cfu</b>	<b>16</b>	<b>Day 0, coarse spray</b>	<b>Day 35</b>
<b>8: Vaccine 2, 10<sup>8</sup> cfu</b>	<b>16</b>	<b>Day 0, coarse spray</b>	<b>Day 35</b>
<b>9: Vaccine 2, 10<sup>9</sup> cfu</b>	<b>16</b>	<b>Day 0, coarse spray</b>	<b>Day 35</b>

#### **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.

**As the chicken is the target animal species, these are also the best model for this study. As the aim is to measure the dose response of the vaccine on the animal itself, no replacement of the in-vivo model is possible. By combining the testing of vaccine candidates, only 1 positive control group is needed. The latter is reduced to 10 animals if this is possible, based in the results of 201609.1. Refinement will be fulfilled by monitoring the animals to precisely set and act upon the humane endpoint.**

**Further reduction will take place if only 1 or 2 vaccine candidates are selected in study 201906.2. In that case the testing for efficacy will be combined with testing the MID, leading to the use of 1 positive control group for both instead of a positive control group per study (a reduction of 16 animals).**

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

**Animals exhibiting severe clinical signs of illness or discomfort which leads to impaired physiological behaviour and/or the inability to maintain homeostasis will be euthanized, as the humane endpoint has therefore been reached. All animals will be inspected every 6 hours to ensure that clinical signs are not missed and therefore the humane endpoint is accurately set and the animal is euthanized timely, preventing unnecessary suffering. All handling will be done by experienced animal technicians, ensuring the minimization of stress.**

### **Repetition and duplication**

#### **E. Repetition**

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

**The tested vaccine candidates were developed recently and have not yet been tested for their dose-response relationship.**

### **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.

**To accurately determine the dose-response relationship, the immune system must not be iatrogenically influenced. Therefore, no analgesics will be used as this will interfere with the study results. The animals will be clinically inspected every 6 hours to ensure accurate determination of the humane endpoint and timely euthanasia.**

**The standard procedure for intra-tracheal inoculation is swift, and it appears that the effects of anaesthetizing the animal do not outweigh the limited stress of the procedure. If, however, the circumstances become unfavourable towards the animal's welfare, it will be decided to put the animal under inhalation anaesthesia during intra-tracheal inoculation.**

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?

**Stress due to handling and identification measures; stress due to vaccine administration; stress due to challenge administration.**

Explain why these effects may emerge.

**Fixation to place identification wing-tags; vaccination by spray; fixation for challenge; administration of intra-tracheal challenge.**

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

**All fixation and administration procedures will be performed by experienced animal technicians, ensuring fast and accurate administration minimizing stress for the animals.**

### 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 exhibiting severe clinical signs of illness or discomfort which leads to impaired physiological behaviour and/or the inability to maintain homeostasis will be euthanized, as the humane endpoint has therefore been reached.**

**Respiratory signs or circulatory defects may be possible due to colibacillosis. In general, severe respiratory distress lasting 6 hours is considered a humane endpoint. All animals will be inspected every 6 hours to ensure that clinical signs are not missed and therefore the humane endpoint is accurately set, meaning the animal is euthanized timely, preventing unnecessary suffering.**

Indicate the likely incidence.

**48/144 animals (The animals of the challenge control groups and, reasoning from the worst case scenario, the groups receiving the lowest dosages of vaccine)**

### 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').

**48/144 animals: severe discomfort (the animals of the challenge control groups and,**

reasoning from the worst case scenario, the groups receiving the lowest dosages of vaccine)  
96/144 animals: moderate discomfort (the other vaccinated animals)

## 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.

**To determine the dose-response relationship, all organs must be assessed for gross lesions indicative of colibacillosis.**

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	<b>22400</b>	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	<b>BIAHO bv</b>	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.  <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number  <b>3.4.4.5</b>	Type of animal procedure  <b>201609.5 Evaluation of the cross-protection of candidate APEC-vaccines using the minimum immunising dose</b>

#### 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.

**[201609.5 Evaluation of the cross-protection of candidate APEC-vaccines using the minimum immunising dose]**

**Avian Pathogenic E. Coli (APEC) is a bacterium causing a wide spectrum of inflammations in chickens, making it a major problem for which antibiotics are applied. To prevent the use of large quantities of antibiotics, vaccines against APEC are desired. In the project a challenge model, virulence and persistence, efficacy and minimum immunising doses (MID) of the vaccine candidates are tested. This study continues with investigating the cross protection each final vaccine candidate provides against challenge with E. coli of a heterologous serotype. The MIDs, determined in 201609.4, are applied.**

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

**A maximum of two candidate vaccine strains will be tested for the provided cross-protection. Chickens will be vaccinated as day-old chicks. There will be three groups per vaccine candidate and three groups for the commercially available APEC vaccine (for a total of 9 vaccine groups). Challenge will be done intra-tracheally at 5 weeks of age of the birds. For each vaccine, one group will be challenged with a challenge strain of serotype O1, one group with a challenge strain of serotype O2 and the last group with a challenge strain of serotype O78 (thus using all 3 groups per vaccine; see also the table below).**

The homologous strain is included to determine whether the birds are protected against it, which would confirm accurate application of the vaccines. The birds will then be observed for 24 or 48 hours (depending on the results of the effect of the challenge, study 201609.1) for onset of disease and/or general performance. This is registered through a clinical score, described by Antao et al (2008).

Group	N	Vaccination (D0)	Challenge (D35)
1: positive control strain O1	16	NA	O1
2: positive control strain O2	16	NA	O2
3: positive control strain O78	16	NA	O78
4: Vaccine candidate 1 challenge O1	16	Candidate 1	O1
5: Vaccine candidate 1 challenge O2	16	Candidate 1	O2
6: Vaccine candidate 1 challenge O78	16	Candidate 1	O78
7: Vaccine candidate 2 challenge O1	16	Candidate 2	O1
8: Vaccine candidate 2 challenge O2	16	Candidate 2	O2
9: Vaccine candidate 2 challenge O78	16	Candidate 2	O78
10: Commercial vaccine challenge O1	16	Commercial vaccine	O1
11: Commercial vaccine challenge O2	16	Commercial vaccine	O2
12: Commercial vaccine challenge O78	16	Commercial vaccine	O78

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

In the given reference (Antao et al, 2008), a significant difference in mean organ lesion score between a pathogenic and non-pathogenic E coli strain was found using 20 animals per group (15 sacrificed 24 hours post-challenge and 5 animals 48 hours post-challenge). The average lesion score of the animals treated with the pathogenic strain was 7,5 ( $\mu$ ); the standard deviation was 2,2( $\sigma$ ). In our study, we wanted to be able to detect a difference of at least 2,5 between average lesion scores ( $\delta$ ). The significance level  $\alpha$  was set on 0,05; the power ( $1-\beta$ ) was set on 80%. The standardized difference then becomes  $2,5/2,2=1,14$ . Given these values, a power analysis based on a t-test as used in Antao indicates a sample size of 14 to be adequate (see, for example, <http://biomath.info/power/ttest.htm>). Since the Antao score is

not a continuous variable but yields a range of integer values, a non-parametric test such as a Mann-Whitney or Wilcoxon test is preferable; for these tests, a sample size of 14 is still adequate. It was decided that 16 animals per time point, per group will be included. Maximally 10 animals can be housed in 1 isolator, and groups of 8 give an equal distribution over two isolators. This optimizes the odds of finding a significant result, while minimally wasting isolator capacity and simultaneously minimizing animal numbers. Challenge strains from 3 serotypes are tested to determine cross protection provided by each of the three applied vaccines and confirm adequate vaccine application. This means that for each challenge strain a positive control group is required (resulting in 3 positive control groups). The goal of the challenge is to induce disease in 50% of the non-vaccinated animals. The extent of cross-immunity is determined by comparing the level of protection between the vaccinated groups.

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

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

**A maximum of 192 SPF chickens will be used. 144 will be vaccinated by spray as day-old chicks (day 0); 48 for each vaccine (2 candidates and the commercially available vaccine). On day 35 (5 weeks) all 192 animals (the vaccinated and positive control chickens) are intra-tracheally challenged according to the developed challenge models. For each challenge strain, 16 animals per vaccine/control group will be challenged. All animals will receive a clinical score to quantify colibacillosis related symptoms. At the end of the study, all animals will be necropsied for the presence of colibacillosis related signs, following the scoring protocol as described in the study of Antao et al, 2008. Depending on the results of the clinical and necropsy scores, additional tissue samples of the organs may be taken to determine whether the challenge bacterium can be re-isolated.**

#### **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.

**As the chicken is the target animal species, these are also the best model in this study. As the aim is to measure whether the vaccine also provides protection against heterologous challenge in the animal, replacement of the in-vivo model is not possible. As the adequate challenge of each challenge strain and vaccine application need to be confirmed, 3 positive control groups are necessary. Refinement will be fulfilled by monitoring the animals to precisely set and act upon the humane endpoint.**

**The standard procedure for intra-tracheal inoculation is swift, and it appears that the effects of anaesthetizing the animal do not outweigh the limited stress of the procedure. If, however, the circumstances become unfavourable towards the animal's welfare, it will be decided to put the animal under inhalation anaesthesia during intra-tracheal inoculation.**

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

**Animals exhibiting severe clinical signs of illness or discomfort which leads to impaired physiological behaviour and/or the inability to maintain homeostasis will be euthanized,**

as the humane endpoint has therefore been reached. All animals will be inspected every six hours to ensure that clinical signs are not missed and therefore the humane endpoint is accurately set and the animal is euthanized timely, preventing unnecessary suffering. If necessary, inhalation anaesthesia will be used during the intra-tracheal inoculation. All handling will be done by experienced animal technicians, ensuring that stress is kept to a minimum.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

**The tested vaccine candidates were developed recently and have not yet been tested for their cross-protection against a heterologous challenge.**

## 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.

**To accurately determine the cross-protection of each vaccine, the immune system must not be iatrogenically influenced. Therefore, no analgesics will be used as this will interfere with the study results. The animals will be clinically inspected at least every six hours to ensure accurate determination of the humane endpoint and timely euthanasia. If necessary, inhalation anaesthesia will be used during the intra-tracheal inoculation.**

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?

**Stress due to handling and identification measures; stress due to vaccine administration; stress due to challenge administration.**

Explain why these effects may emerge.

**Fixation to place identification wing-tags; vaccination by spray; fixation for challenge; administration of intra-tracheal challenge.**

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

**All fixation and administration procedures will be performed by experienced animal technicians, ensuring fast and accurate administration minimizing stress for the animals. Animals exhibiting severe clinical signs of illness or discomfort which leads to impaired physiological behaviour and/or the inability to maintain homeostasis will be euthanized, as the humane endpoint has therefore been reached. If necessary, inhalation anaesthesia will be used during the intra-tracheal inoculation.**

#### **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 exhibiting severe clinical signs of illness or discomfort which leads to impaired physiological behaviour and/or the inability to maintain homeostasis will be euthanized, as the humane endpoint has therefore been reached.**

**Respiratory signs or circulatory defects may be possible due to colibacillosis. In general, severe respiratory distress lasting 6 hours is considered a humane endpoint. All animals will be inspected every 6 hours to ensure that clinical signs are not missed and therefore the humane endpoint is accurately set, meaning the animal is euthanized timely, preventing unnecessary suffering.**

Indicate the likely incidence.

**144/192 (75%) animals**

#### **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').

**144/192 animals: severe discomfort (the positive control groups and the vaccinated animals receiving heterologous challenge; assuming worst case scenario that no cross protection whatsoever is provided by the vaccines)**

**48/192 animals: moderate discomfort (vaccinated animals receiving homologous challenge)**

### **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.

**To determine the extent of cross-protection through organ lesion scores and organ bacterial count, all animals are necropsied at the end of the study.**

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

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

Yes



## DEC-advies 201609

---

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.*

*Herhaling van antwoorden is niet nodig. Indien van toepassing kan verwezen worden naar een bij een eerdere vraag verstrekt antwoord.*

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 201609
2. Titel van het project  
Development of a vaccine against avian pathogenic E. Coli (APEC)
3. Titel van de NTS  
Ontwikkeling van een vaccin tegen E. Coli bij kippen
4. Type aanvraag:
  - X nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - DEC BI Weesp
  - [REDACTED]
  - [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 

ontvangen door DEC	15 augustus 2016
aanvraag compleet	17 oktober 2016
in vergadering besproken	22 augustus 2016 en 24 oktober 2016
anderszins behandeld	Via email tussen 22 aug 16 en 24 okt 16
termijnonderbreking(en) van / tot	
besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen	
aanpassing aanvraag	Enkele in beoordelingsperiode
advies aan CCD	25 oktober 2016
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.  
De DEC heeft van de IvD een schrijven ontvangen waarin wordt aangegeven dat de IvD instemt met de aanvraag.

*Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest.*

8. Eventueel horen van aanvrager
  - Datum 22 augustus 2016 en 24 oktober 2016
  - Plaats Weesp
  - Aantal aanwezige DEC-leden 6 en 6
  - Aanwezige (namens) aanvrager [REDACTED]
  - Gestelde vraag / vragen Zie hieronder
  - Verstrekt(e) antwoord(en) Zie hieronder
  - Het horen van de aanvrager heeft wel geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager (alleen uitwisseling van informatie via email)
  - Datum
  - Gestelde vraag/vragen

- Datum antwoord
- Verstrek(t)e antwoord(en)
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Advies expert

## B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.

*Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.*

Het Project is vergunningplichtig

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.

3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.

De contact persoon van de DEC [REDACTED] is ook de gemachtigde van de vergunninghouder maar is geen lid van de DEC en neemt ook niet deel aan de besluitvorming van de DEC.

Er zijn geen leden van de DEC uitgesloten van behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies.

## C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*). Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De aanvraag komt overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Wat is een project': De verschillende subdoelen zijn zowel tijdsafhankelijk als uitkomstafhankelijk van elkaar. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Flora- en faunawet). Er is, voor zover bij de DEC bekend, geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de

proef in de weg zou kunnen staan.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.  
De aangeleverde studie valt onder toegepast en translationeel onderzoek daar het de toepassing van micro-organismen, die in het laboratorium geschikt lijken als vaccin, toetst op dieren. De verkregen gegevens worden gebruikt om te bepalen of het vaccin geschikt is voor toepassing in de praktijk. Hiermee sluit de hoofddoelstelling van het voorstel aan op de doelcategorie toegepast onderzoek.

#### *Belangen en waarden*

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).  
Het directe doel van de aanvraag is het onderzoeken van kandidaat vaccins tegen Colibacillosis bij kippen. Het uiteindelijke doel van de aanvraag is het op de markt brengen van een nieuw vaccin tegen Colibacillosis. De onderzoeker heeft voldoende duidelijk gemaakt dat er in de markt behoefte is aan betere of aanvullende vaccins tegen de betreffende aandoening. Het directe doel van het project is gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.
5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*)

Proefdier	welzijn, pijn, natuurlijk gedrag, integriteit
Doeldier	welzijn, gezondheid
Eigenaar van doeldier	welzijn, reductie kosten
Maatschappij	voldoende gezond voedsel van dierlijke oorsprong
Bedrijf	winst behaald uit verkoop van vaccins voor dieren
Onderzoeksgroep	behalen van persoonlijke beroeps- en financiële doelen
6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wet- en regelgeving op het gebied van het omgaan met voor het milieu risicovolle stoffen of organismen.  
Het onderzoek betreft werk met genetisch gemodificeerde micro-organismen waarvoor een specifieke vergunning is verleend door de bureau GGO.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).  
De onderzoeksgroep heeft ruime ervaring met onderzoek bij de betreffende diersoort en met de biologische agentia die getest worden. Voor zover van toepassing hebben ook andere betrokkenen voldoende kennis en kunde om een optimale haalbaarheid van het project te garanderen.
8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. *Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).  
De gekozen strategie en de experimentele aanpak zijn afdoende om de beschreven

doelstelling te realiseren. Dit is gebaseerd op:

- realistische beschrijving van de onderzoeksdoelen
- ervaring met de onderzoek modellen
- duidelijk beschreven beslismomenten
- voldoende tijd om de doelstelling te realiseren binnen de looptijd van het project

### *Welzijn dieren*

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- X Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

De onderzoeker heeft de volgende toelichting gegeven voor het niet toepassen van verdoving of pijnbestrijding. De DEC steunt deze toelichting.

To determine the most accurate clinical score and reliable organ bacterial counts, the animals must exhibit the natural clinical symptoms. Therefore the use of anaesthesia or analgesia will interfere with the study. If, however, it appears that the chickens experience severe discomfort during the intra-tracheal challenge procedure, outweighing the effects of anaesthesia, the animals will be anaesthetized by inhalation during the challenge procedure. To minimize suffering, the animals will be euthanized as soon as the humane end point is reached.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. De dieren worden gehuisvest conform bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

Het cumulatief ongerief is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Er zullen verschillen optreden in de mate van ongerief tussen de verschillende groepen dieren. Meest relevant voor de afweging zijn daarbij de groepen waarvoor ernstig ongerief wordt verwacht. Dit betreft het ongerief dat de dieren kunnen ondergaan als gevolg van het toepassen van de besmetting met de daarbij behorende verschijnselen van de betreffende ziekte.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

De huisvestingsomstandigheden brengen een geringe mate van beperking van het natuurlijk gedrag van de dieren met zich mee. Daarmee is de integriteit van de dieren in geringe mate aangetast.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). In de aanvraag zijn duidelijke criteria vermeld op basis waarvan het humaan eindpunt wordt toegepast. Ook is duidelijk vermeld wie de bevoegdheid heeft om te besluiten tot het toepassen van een humaan eindpunt. Er is onmogelijk een betrouwbare inschatting te maken van het aantal dieren waarop het humaan eindpunt van toepassing zal zijn. De DEC kan daarom ook geen andere inschatting maken dan die gemaakt is door de onderzoeker.

### 3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Het onderzoek vindt plaats op het doeldier en er is op dit moment geen alternatief beschikbaar om veiligheid en werkzaamheid vast stellen in het doeldier.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Het aantal te gebruiken dieren is gebaseerd op een berekening die borgt dat bij de bekende variabiliteit en beschreven verwachte verschillen een heldere conclusie getrokken kan worden zonder dat daar meer dieren voor gebruikt zijn dan nodig. De beschreven strategie is zodanig dat indien lopende het onderzoek het mogelijk is om de benodigde aantallen bij te stellen dit ook gebeurt.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Het zo humaan mogelijk uitvoeren van het project wordt gewaarborgd door zo min mogelijk dieren te gebruiken en het ongerief van de dieren zoveel als mogelijk is te beperken, wat op de volgende manieren is bewerkstelligd:

- i. Het aantal dieren is berekend middels een power-berekening; deze is door de DEC gecorrigeerd en heeft geleid tot vermindering van het aantal dieren.
- ii. Omdat het doel van het project het ontwikkelen van een vaccin is, dient het immuunsysteem van de dieren op geen enkele wijze beïnvloed te worden. Om deze reden wordt het toepassen van anesthesie en analgesie onverenigbaar met de proef geacht. De uitzondering hierop is vermeld in bijlagen 3, 4 en 5; mochten er omstandigheden ontstaan waardoor de intra-tracheale challenge een te grote welzijnsaantasting wordt, dan zal het dier hiervoor onder algehele anesthesie gebracht worden. De huisvesting van de dieren geschiedt in isolatoren; de beschikbare ruimte en kooiverrijking voldoet aan de Europese Richtlijn 2010/63/EU.
- iii. Daar er geen analgesie kan worden toegepast, is de beschrijving van de humane eindpunten des te belangrijker. Deze is toegespitst op 1) het te verwachten ziektebeeld door het agens 2) de uit de literatuur bekende incubatieperiode en 3) het soortspecifieke gedrag van de kip. Hierdoor worden dieren die ongerief ondervinden snel als zodanig herkend, waardoor de mate en duur van ongerief geminimaliseerd wordt.

- iv. De reden van doden is het op sectie willen vaststellen dat het waargenomen ziektebeeld toe te schrijven is aan de toegediende agentia. Daarbij worden orgaanscores gebruikt om kwantitatief de verschillen tussen de geteste agentia aan te kunnen tonen. De wijze van doden geschiedt volgens Richtlijn 2016/63/EU (middels gas of cervicale dislocatie); na de euthanasie wordt gecontroleerd of daadwerkelijk de dood is ingetreden.
  - v. Voor het project worden dieren van beide geslachten gebruikt
17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe. Omdat de aanvraag onderzoek betreft naar nieuwe door het bedrijf zelf gegenereerde vaccin kandidaten is het niet mogelijk dat het aangevraagde onderzoek op deze materialen al eerder is uitgevoerd. Van duplicatie kan dus geen sprake zijn.

*Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).  
Er worden dieren van beide geslachten ingezet.
19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).  
Er worden wel dieren gedood in het kader van het project. Dit zal onderdeel zijn van de proef omdat een belangrijke parameter is de beoordeling van de organen van de dieren. Er wordt een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU
20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.  
Niet van toepassing

*NTS*

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

## **D. Ethische afweging**

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).  
Rechtvaardigt het directe doel van het project, aangevuld met het uiteindelijke doel, en de haalbaarheid van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan.
2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale

en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden*).

Proefdier	Ernstig nadeel
Doeldier	Matig tot groot voordeel
Eigenaar van doeldier	Matig tot groot voordeel
Maatschappij	Matig voordeel
Bedrijf	Matig voordeel
Onderzoeksgroep	Matig voordeel

De proefdieren zijn de enige belanghebbenden die nadeel ondervinden. Dit nadeel is ernstig omdat een deel van de dieren zeer ziek kan worden. Daarbij ondervindt het doeldier een matig tot groot voordeel, daar colibacillose een veelvoorkomende ziekte is welke door de vele ontstekingen en verhoogde sterfte het welzijn van commercieel pluimvee nadelig beïnvloedt. Het preventief kunnen vaccineren zou het welzijn sterk verhogen, zeker omdat het toepassen van de spray-vaccinatie weinig invloed heeft op het welzijn van het dier.

De eigenaar van het doeldier heeft hier ook matig tot groot voordeel van. De ziekte komt veelvuldig en overal ter wereld voor en betekent een verliespost, daar de kippen minder produceren (verminderde eiproduktie, verlaagd slachtgewicht, afgekeurd op slachthuis, verhoogde uitval) en men moet investeren in behandelingen.

Juist deze behandelingen maken dat de maatschappij ook matig voordeel heeft. De toegenomen antibiotica-resistentie maakt dat vaccinatie een sterke voorkeur heeft boven behandeling. De consument vreest (zij het terecht of onterecht) de aanwezigheid van antibiotica in vlees. Het kunnen vaccineren tegen APEC en daarmee terugdringen van het antibioticagebruik zal het maatschappelijk vertrouwen ten opzichte van de pluimveehouderij ten goede komen.

Het bedrijf zal een matig voordeel ondervinden middels de verkoop en bekendheid van het product.

Tenslotte zal de onderzoeksgroep ervaring opdoen omtrent onderzoek naar niet-virus gebaseerde vaccins en profiteren van de bekendheid van het product, mede in de vorm van het uit kunnen voeren van aanvullend onderzoek.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld*).

De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het ontwikkelen van een vaccin tegen een ernstige, besmettelijke ziekte bij kippen. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en

experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen, te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en om te kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is ook van mening dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat het voor het ontwikkelen van een vaccin tegen Colibacillosis met als uiteindelijk doel het op de markt brengen van betere vaccins op de wijze zoals beschreven in dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

## E. Advies

1. Advies aan de CCD
  - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificieer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*). Het advies is een meerderheidsbesluit. Eén DEC lid is van mening dat de gekozen aanpak onvoldoende kans van slagen heeft om met succes een vaccin te ontwikkelen dat niet alleen een homologe bescherming biedt maar ook een heterologe bescherming hetgeen een essentieel aspect voor een succesvol vaccin. Overwogen is daarbij dat uit de wetenschappelijke literatuur nauwelijks aanwijzingen te vinden zijn dat er kruisbescherming geboden kan worden door een verzwakt levend vaccin dat een intact O-antigeen bezit. Voor studie 5 is daarom zeer weinig wetenschappelijk basis om 192 dieren op te offeren.
3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

### **Vragen van de DEC en mondelinge antwoorden van de onderzoeker die afdoende zijn bevonden door de DEC:**

- Vraag Het onderzoeksmodel beschrijft slechts 1 vaccinatie en maakt gebruik van SPF dieren. Zal de enkelvoudige vaccinatie ook de praktijk behandeling zijn of is dat nog niet duidelijk.
- Antwoord Op dit moment wordt alleen bestudeerd of de kandidaten die beschikbaar zijn werkzaamheid vertonen volgens het model dat is beschreven in de literatuur (proof of concept). Als dat het geval blijkt zal pas gewerkt gaan worden aan een complete product strategie waar de toediening en het aantal toedieningen onderdeel van moeten zijn.
- Vraag Het Poulvac product van Zoetis wordt gebruikt als vergelijkingsproduct, waarom is dat nodig
- Antwoord Er is nog geen gevalideerd model en daarom wordt een product getest waarvan bekend is dat het werkt. Daarmee kan een soort primaire validatie worden gedaan van het model. Als het Poulvac product in dit model geen werkzaamheid laat zien dan is het model wellicht niet geschikt om werkzaamheid aan te tonen.
- Vraag In de aanvraag wordt beschreven dat de meeste verschijnselen worden verwacht op 24 uur na toediening van de challenge. Is het dan wel zinvol om een 48 uur punt toe te voegen ?
- Antwoord Er zit wat variabiliteit in de uitlezing (ook tussen challenge stammen) en de bekende gegevens zijn niet in onze faciliteiten gegenereerd. We houden er daarom rekening mee dat in onze situatie de verschijnselen ook iets later zichtbaar kunnen worden. Daarom wordt in de opzet van de challenge beide tijdstippen bekeken.



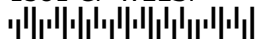


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Boehringer Ingelheim Animal Health Operations BV

J.C. van Houtenlaan 36

1381 CP WEESP



**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  
AVD224002016731

**Bijlagen**

2

Datum 3 november 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 28 oktober 2016. Het gaat om uw project "Development of a vaccine against avian pathogenic E. Coli ( apec)". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD224002016731. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 22400

Naam instelling of organisatie: Boehringer Ingelheim Animal Health Operations BV

Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde:

KvK-nummer: 55530133

Straat en huisnummer: J.C. van Houtenlaan 36

Postcode en plaats: 1381 CP WEESP

IBAN: NL52DEUT0265175240

Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Boehringer Ingelheim AHO

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie:

Afdeling: Animal Investigations Group

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Gegevens gemachtigde

KvK-nummer: 55530133  
Naam: [REDACTED]  
Adres: J.C. van Houtenlaan 36  
Postcode en plaats: 1381 CP WEESP  
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

**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: Development of a vaccine against avian pathogenic E. Coli ( apec)  
Titel niet-technische samenvatting: Ontwikkeling van een vaccin tegen E.coli bij kippen  
Naam DEC: DEC BIAHO  
Postadres DEC: Postbus 36 1380 AA Weesp  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.727,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting  
Overige bijlagen:  Melding Machtiging  
 DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:

[Redacted]

Functie:

[Redacted]

Plaats:

Weesp

Datum:

28 oktober 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Boehringer Ingelheim Animal Health Operations BV

[REDACTED]  
J.C. van Houtenlaan 36  
1381 CP WEESP



**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  
AVD224002016731

**Bijlagen**

2

Datum 3 november 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 3 november 2016

Vervaldatum: 3 december 2016

Factuurnummer: 16700731

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD224002016731	€ 1.727,00

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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Boehringer Ingelheim Animal Health Operations BV

J.C. van Houtenlaan 36

1381 CP WEESP



**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

AVD224002016731

**Bijlagen**

1

Datum 18 januari 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 "Development of a vaccine against avian pathogenic E. Coli ( apec)" met aanvraagnummer AVD224002016731. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

#### **Beslissing**

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

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

U kunt met uw project "Development of a vaccine against avian pathogenic E. Coli ( apec)" starten. De vergunning wordt afgegeven van 19 januari 2017 tot en met 1 november 2021.

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.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC BIAHO gevoegd. Dit advies is opgesteld op 25 oktober 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel

10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

**Datum:**  
18 januari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD224002016731

### **Bezwaar**

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

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

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

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

### **Meer informatie**

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



Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



H. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

**Datum:**  
18 januari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD224002016731



# Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Boehringer Ingelheim Animal Health Operations  
BV

Adres: J.C. van Houtenlaan 36

Postcode en plaats: 1381 CP WEESP

Deelnemersnummer: 22400

deze projectvergunning voor het tijdvak 19 januari 2017 tot en met 1 november 2021, voor het project "Development of a vaccine against avian pathogenic E. Coli ( apec)" met aanvraagnummer AVD224002016731, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC BIAHO. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

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 3 november 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 3 november 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 25 oktober 2016, ontvangen op 3 november 2016.

**Aanvraagnummer:**  
AVD224002016731

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1 201609.1 Development of challenge models for 3 APEC seratypes</b>				
	Kippen / SPF-dieren	576	50% Ernstig 50% Matig	
<b>3.4.4.2 201609.2 Virulence and persistence of 2 wildtype and 6 modified APEC strains to be used in vaccine formulation</b>				
	Kippen / SPF-dieren	144	25% Ernstig 75% Matig	
<b>3.4.4.3 201609.3 Efficacy of vaccine candidates against APEC infections compared to a commercially available vaccine</b>				
	Kippen / SPF-dieren	96	17% Ernstig 83% Matig	
<b>3.4.4.2 201609.4 Minimum immunising dose finding study for vaccine candidates against APEC</b>				
	Kippen / SPF-dieren	144	33% Ernstig 67% Matig	
<b>3.4.4.5 201609.5 Evaluation of the cross-protection of candidate APEC-vaccines using the minimum immunising dose</b>				
	Kippen / SPF-dieren	192	75% Ernstig 25% Matig	

**Aanvraagnummer:**  
AVD224002016731

**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 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:**

AVD224002016731

## 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:**

AVD224002016731

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

**Einde van een dierproef**

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

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

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

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

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

**Beoordeling achteraf**

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