

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	Documenten 20172905	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	DEC-advies				x		x		
7	Ontvangstbevestiging				x		x		
8	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
9	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
10	Adviesnota CCD		x						x
11	Beschikking en vergunning				x		x		



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10800 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
		KvK-nummer	30275924
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
		Postbus	12007
		Postcode en plaats	3501AA Utrecht
		IBAN	NL27INGB0000425267
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]

1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.	(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.
	Functie	
	Afdeling	
	Telefoonnummer	
	E-mailadres	
1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	☐ Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> mee met deze aanvraag ☒ Nee	

2 Over uw aanvraag

2.1 Wat voor aanvraag doet u?	☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3 ☐ Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2 ☐ 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 <i>wijziging</i> 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 <i>melding</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?	☐ Nee > Ga verder met vraag 3 ☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum 1 - 10 - 2017 Einddatum 1 - 10 - 2020
3.2 Wat is de titel van het project?	Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC DEC Utrecht Postadres Postbus 85500 3508 GA Utrecht E-mailadres dec-utrecht@umcutrecht.nl

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287 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

Datum

Handtekening



Format

Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

In de pluimvee industrie wordt bescherming tegen infectieziekten nagestreefd door middel van vaccinatie

en het gebruik van medicijnen in het voer. Het gebruik van deze medicijnen wordt meer en meer aan banden gelegd, omdat dit kan leiden tot resistentie tegen antibiotica. Hoewel antibiotica zelf niet direct een antiviraal effect hebben, kunnen ze wel een rol spelen in het ziekteverloop na een virale infectie.

Omdat het gebruik van medicijnen in voer steeds minder wordt toegestaan, worden effectieve vaccins die de afweer verbeteren steeds belangrijker om kippen te beschermen tegen virale en bacteriële infecties. Dit is zowel voor leghennen als vleeskippen van belang. Beide worden veelvuldig gevaccineerd in de eerste weken van hun leven. Omdat vleeskippen relatief kort leven in vergelijking met leghennen, is het verbeteren van de afweer op de lange termijn vooral belangrijk voor leghennen die herhaaldelijk gevaccineerd moeten worden.

Om effectieve vaccins te ontwerpen is het van essentieel belang om te begrijpen hoe het afweersysteem pathogenen bestrijdt. Het afweersysteem bestaat uit twee delen, het innate (oftewel het aangeboren) en het adaptieve afweersysteem. De innate afweer vormt de eerste verdedigingslinie tegen binnendringende pathogenen en wordt binnen enkele uren aanzet. Het adaptieve afweersysteem komt pas na 5-7 dagen op gang en zorgt voor de vorming van antistoffen en T cellen die specifiek zijn voor het desbetreffende pathogeen.

Huidige vaccins zijn vooral gericht op het versterken van het adaptieve deel van het afweer systeem. Een voordeel van het versterken van de innate afweer is dat op deze manier de eerste verdedigingslinie direct versterkt wordt. Het stimuleren van het adaptieve afweersysteem leidt tot pathogeen specifieke responsen die langer standhouden, maar die ook meer tijd nodig hebben om te ontstaan. Hierdoor heeft het pathogeen meer gelegenheid om zich te vermenigvuldigen en schade toe te brengen aan de gastheer.

Een belangrijke component van het innate afweersysteem is de zogenaamde "natural killer" (NK) cel. Deze killer cellen zijn in staat om virus geïnfecteerde cellen te doden en spelen dan ook een belangrijke rol in de eerste afweer reactie nadat een virus de gastheer binnenkomt. Virussen kunnen deze NK cellen op verschillende manieren aanzetten. Een manier is door binding van virale eiwitten aan activerende receptoren op het oppervlak van de NK cel, wat leidt tot NK cel activatie. Voorbeelden van liganden voor activerende NK cel receptoren in de mens zijn virale eiwitten zoals het haemagglutinine eiwit van het influenza virus^{1, 2} en het pp65 eiwit van cytomegalovirus³. Ook in de kip kan bestaan dergelijke receptoren. We hebben recentelijk aangetoond dat binding van het vogelgriep virus aan activerende NK cel receptoren in de kip inderdaad leidt tot NK cel activatie⁴. Daarnaast kunnen cytokines die gemaakt worden door andere cellen van het innate afweersysteem zoals IL-12 en IFN α /b NK cellen aanzetten (reviewed in⁵).

Een belangrijke functie van geactiveerde NK cellen is het doden van virus geïnfecteerde cellen. Daarnaast zijn NK cellen belangrijk in het initiëren van de adaptieve afweer respons die vervolgens op gang komt. NK cellen kunnen zowel een direct effect als een indirect effect hebben op de ontwikkeling van de specifieke afweer reactie. NK cellen produceren cytokinen zoals IFN γ en IL-10⁶—die een direct effect hebben op T cellen⁷. Daarnaast kunnen NK cellen de specifieke afweer op een indirecte manier beïnvloeden door een interactie met zogenaamde dendritische cellen⁸ die dan op hun beurt de T cellen activeren.

Er is nog weinig bekend over NK cellen in de kip. Enkele jaren geleden zijn door onze groep een aantal technieken opgezet waarmee de aanwezigheid en het functioneren van deze cellen gemeten kan worden⁹. Met behulp van deze technieken is de NK cel activiteit na infectie met verschillende pluimvee virussen onderzocht. Er is aangetoond dat de activiteit van NK cellen in de long verhoogd is na infectie met een mild vogelgriep virus. Infectie met hoog pathogene H5N1 virussen resulteerde daarentegen in een verlaagde NK cel activiteit¹⁰. Ook na infectie met het respiratoire Infectious Bronchitis Virus (IBV) is de activiteit van long NK cellen verhoogd¹¹. Verschillende virussen zijn dus in staat om NK cellen in de kip te activeren.

Hoe en waar de virussen de kippen NK cellen aanzetten is nog niet duidelijk. Ook is niet bekend of NK cellen uitsluitend geactiveerd worden door levende virussen, of dat ook (geïnactiveerde) vaccin stammen leiden tot een verhoogde NK cel activiteit. Daarnaast is het de vraag of verschillende virussen variëren in hun strategie om NK cellen aan te zetten, of dat er een uniform mechanisme is waardoor de NK cel wordt aanzet tijdens een virale infectie.

In dit project zal de NK activiteit bestudeerd worden na infectie met verschillende pluimvee virussen en na vaccinatie met verschillende pluimvee vaccins. De focus zal liggen op twee economisch relevante

pluimvee virussen nl het respiratoire virus IBV en Marek's Disease Virus (MDV), een kippen herpesvirus. Eerdere studies hebben een verhoogde activiteit van long NK cellen laten zien na infectie met IBV M41. Het is niet duidelijk of deze verhoging ook optreedt na infectie met een andere IBV stam of na vaccinatie.

In vitro tests laten een verhoogde NK cel activiteit zien wanneer NK cellen 24 uur lang gekweekt zijn in aanwezigheid van MDV. Dit suggereert dat MDV in staat is om ook *in vivo* NK cellen te activeren. De vaccin stam induceerde een milde verhoging van de NK activiteit *in vitro* en de NK activiteit nam meer toe na incubatie met het virus RB-1B. *In vitro* onderzoek met IBV heeft ook plaatsgevonden, maar tot op heden is het niet gelukt om NK geïsoleerd uit kippen cellen te activeren door een co-kweek met IBV. Dit is in tegenstelling tot de *in vivo* experimenten die wel een verhoogde NK activiteit laten zien¹¹

Het doel van deze experimenten is

1. om de NK cel activiteit na infectie met deze twee pluimvee virussen te bestuderen om zo meer te leren over hoe verschillende virussen NK cellen aanzetten
2. om vast te stellen of er verschil is in NK cel activatie na infectie versus vaccinatie.

Op dit moment is het niet mogelijk is om *in vivo* NK studies in de kip te vervangen door *in vitro* experimenten. Het is totaal niet duidelijk hoe het *in vitro* werk zich verhoudt tot wat er *in vivo* gebeurt. Als een embryonale NK cel reageert in een *in vitro* assays, zegt dat niks over wat een long NK cel gaat doen na een respiratoire infectie. Het doel van deze aanvraag is juist om beter te gaan begrijpen hoe virussen NK cellen activeren, zodat het in de toekomst mogelijk is om *in vivo* proeven gedeeltelijk te vervangen door *in vitro* werk.

Ook bevat deze aanvraag naast levende virussen studies met vaccins. Wanneer deze experimenten laten zien dat virussen en vaccins een vergelijkbaar effect hebben op de kippen NK cellen, kunnen in de toekomst vaccins gebruikt worden in eventuele *in vivo* proeven om zo het ongerief van de dieren te verminderen.

IBV

Het coronavirus IBV is een ernstig probleem voor de pluimvee industrie. Besmetting kan leiden tot luchtweginfecties en verhoogde gevoeligheid voor *E.coli*, nier problemen en een verminderde ei kwaliteit. In eerdere studies is aangetoond dat infectie met IBV-M41 leidt tot een verhoogde NK cel activiteit in de long¹². Het mechanisme achter deze IBV geïnduceerde NK activiteit is nog niet duidelijk. Een mogelijkheid is dat IBV aan een NK cel receptor bindt waardoor de NK cel wordt aangezet zoals beschreven is voor aviaire influenza⁴. Een andere mogelijkheid is dat het virus epitheel cellen infecteert wat uiteindelijk leidt tot de productie van signaalstoffen die op hun beurt de NK cellen activeren. Wanneer herkenning door NK cellen essentieel is voor de NK cel activiteit, zullen zowel levende virussen als (dode) vaccins NK cellen kunnen aanzetten. Wanneer er infectie van cellen nodig is, zal een vaccin geen NK activiteit induceren. Dus door de NK activiteit te meten in kippen die besmet zijn met verschillende IBV virussen of IBV vaccins kan worden vastgesteld of IBV vaccins en levend virus een vergelijkbare NK response induceren. Deze informatie leidt tot meer inzicht in het mechanisme achter de IBV geïnduceerde NK cel activiteit maar is ook belangrijk voor eventuele dierproeven in de toekomst. Wanneer IBV vaccinatie en IBV infectie hetzelfde resultaat laten zien, kan in de toekomst IBV vaccinatie gebruikt worden als alternatief voor IBV infecties wat leidt tot minder ongerief voor de dieren.

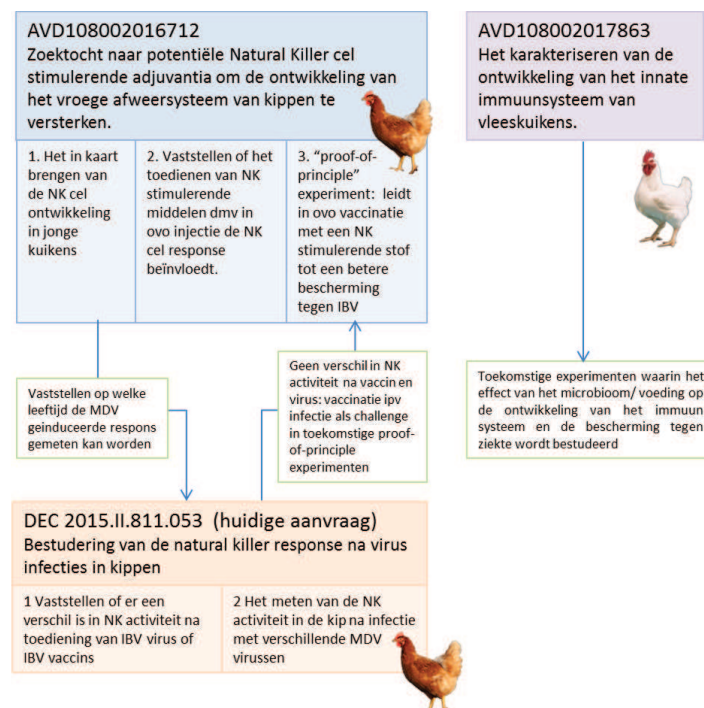
MDV

Marek's Disease virus (MDV) is een zeer besmettelijke ziekte in pluimvee die wordt veroorzaakt door het oncogene α herpesvirus Marek's Disease Virus (MDV). Er bestaan vaccins tegen MDV. Deze vaccins zijn zeer effectief in het bestrijden van de ziekte (tumorvorming) maar beschermen niet tegen infectie en replicatie van het virus. Hierdoor worden de MDV virussen stapsgewijs steeds virulenter waardoor op termijn de huidige vaccins niet meer voldoende bescherming zullen bieden. MDV zorgt voor tumor vorming in visceral organs, verlammingsverschijnselen maar onderdrukt ook het afweer systeem (zogenaamde immuun suppressie). Als gevolg hiervan worden de kippen gevoeliger voor andere infectieuze agentia zoals *E.coli* en is de response op vaccins tegen andere ziekteverwekkers zoals IBV en *Mycoplasma synoviae* minder goed¹². Ook MDV vaccins zoals CVI988 zijn in staat om het afweer systeem te onderdrukken.

Binnen het ERA-NET ANIHW project MADISUP wordt met partners in Duitsland, Frankrijk en Groot Brittannië onderzoek gedaan naar de tijdelijke onderdrukking van het immuunsysteem als gevolg van MDV. Het doel is om aan de ene kant te zoeken naar cellulaire mechanismen die ervoor zorgen dat MDV het afweer systeem onderdrukt, en aan de andere kant om nieuwe vaccins te ontwerpen die het immuunsysteem niet onderdrukken maar die wel zorgen voor bescherming tegen MDV veldstammen.

Onze bijdrage in dit project bestaat uit het onderzoeken van de NK cel response na MDV infectie. Experimenten in het lab met embryonale NK cellen en MDV geïnfecteerde cellen hebben een verhoogde NK activiteit laten zien in vergelijking met niet geïnfecteerde cellen. Dit suggereert dat MDV in staat is om NK cellen te activeren. Een studie uit de jaren 80 heeft beschreven dat de NK activiteit in MDV resistente en gevaccineerde kippen verhoogd is terwijl MDV gevoelige kippen een verlaagde NK cel activiteit laten zien¹³. Het mechanisme hierachter is tot op heden niet bekend. Daarnaast is het niet bekend of NK cellen betrokken zijn bij de onderdrukking van het afweersysteem na MDV infectie. Door met de huidige technieken de NK activiteit na infectie met virulente en MDV vaccin stammen te analyseren kan zowel het directe antivirale effect van NK cellen als de productie van cytokines die andere cellen van het adaptieve immuunsysteem aan zetten bestudeerd worden. Op deze manier kan 1. de rol van NK cellen na MDV infectie beter in kaart worden gebracht en 2. worden onderzocht of de NK cel response betrokken is bij de onderdrukking van het afweer systeem na MDV infectie.

Het bestuderen van de NK activiteit na IBV en MDV infectie zal leiden tot nieuwe kennis over de virus specifieke vroege afweer response. Door de NK activiteit na infectie met deze verschillende wild type virussen en de bijbehorende vaccin stammen te bestuderen kan worden vastgesteld of deze virussen/ vaccins een vergelijkbare strategie hebben om NK cellen te activeren.



Figuur 1. Relatie tussen de huidige CCD aanvraag en eerder (goedgekeurde) CCD aanvragen van de onderzoeksgroep

Referenties

1. Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, Bushkin Y, Davis DM, Strominger JL, Yewdell JW, Porgador A (2001) Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409(0028-0836; 6823):1055-1060
2. Glasner A, Zurunic A, Meningher T, Lenac Rovis T, Tsukerman P, Bar-On Y, Yamin R, Meyers AF, Mandeboim M, Jonjic S, Mandelboim O (2012) Elucidating the mechanisms of influenza virus recognition by Ncr1. *PLoS One* 7(5):e36837

3. Arnon TI, Achdout H, Levi O, Markel G, Saleh N, Katz G, Gazit R, Gonen-Gross T, Hanna J, Nahari E, Porgador A, Honigman A, Plachter B, Mevorach D, Wolf DG, Mandelboim O (2005) Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol* 6(5):515-523
4. Jansen CA, van Haarlem DA, Sperling B, van Kooten PJ, de Vries E, Vierterboeck BC, Vervelde L, Gobel TW (2016) Identification of an Activating Chicken Ig-like Receptor Recognizing Avian Influenza Viruses. *J Immunol* 197(12):4696-4703
5. Zwirner NW, Domaica CI (2010) Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *Biofactors* 36(4):274-288
6. Lee SH, Kim KS, Fodil-Cornu N, Vidal SM, Biron CA (2009) Activating receptors promote NK cell expansion for maintenance, IL-10 production, and CD8 T cell regulation during viral infection. *J Exp Med* 206(10):2235-2251
7. Raulet DH (2004) Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol* 5(10):996-1002
8. Andoniou CE, van Dommelen SL, Voigt V, Andrews DM, Brizard G, Asselin-Paturel C, Delale T, Stacey KJ, Trinchieri G, Degli-Esposti MA (2005) Interaction between conventional dendritic cells and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity. *Nat Immunol* 6(10):1011-1019
9. Jansen CA, van de Haar PM, van Haarlem D, van Kooten P, de Wit S, van Eden W, Vierterboeck BC, Gobel TW, Vervelde L (2010) Identification of new populations of chicken natural killer (NK) cells. *Dev Comp Immunol* 34(7):759-767
10. Jansen CA, de Geus ED, van Haarlem DA, van de Haar PM, Londt BZ, Graham SP, Gobel TW, van Eden W, Brookes SM, Vervelde L (2013) Differential lung NK cell responses in avian influenza virus infected chickens correlate with pathogenicity. *Sci Rep* 3:2478
11. Vervelde L, Matthijs MG, van Haarlem DA, de Wit JJ, Jansen CA (2012) Rapid NK-cell activation in chicken after infection with infectious bronchitis virus M41. *Vet Immunol Immunopathol*
12. Friedman A, Shalem-Meilin E, Heller ED (1992) Marek's disease vaccines cause temporary U-lymphocyte dysfunction and reduced resistance to infection in chicks. *Avian Pathol* 21(4):621-631
13. Sharma JM (1981) Natural killer cell activity in chickens exposed to Marek's disease virus: inhibition of activity in susceptible chickens and enhancement of activity in resistant and vaccinated chickens. *Avian Dis* 25(4):882-893

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het doel van dit project is om

1. Vast te stellen of er een verschil is in NK activiteit na toediening van IBV virus of IBV vaccins
2. De NK activiteit in de kip na infectie met verschillende MDV virussen (vaccin stam virulente stam, mutante virussen waarin enkele virale eiwitten zijn uitgezet) te bepalen.

De onderzoekslijn naar kippen NK cellen is opgezet in 2007. Op dit moment is dit een van de belangrijkste onderzoeklijnen in de aviaire immunologie groep. Na het ontwikkelen van testen om de aanwezigheid en de activiteit van NK cellen te meten⁹ zijn deze technieken in verschillende studies toegepast. In deze studies is de rol van NK cellen tijdens infecties met virussen zoals IBV en vogelgriepvirus bestudeerd^{10, 11}. Er wordt nauw samengewerkt met een onderzoeksgroep uit München die al meer dan 30 jaar onderzoek doet naar kippen NK cellen en naar NK cel receptoren. Het onderzoek naar MDV wordt uitgevoerd in nauwe samenwerking met onderzoeksgroepen in Duitsland en de UK die veel expertise hebben op het gebied van MDV.

3.3 Belang

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

Kennis op het gebied van NK cel biologie in de kip is beperkt. Deze studie zal bijdragen aan meer inzicht

in hoe virussen NK cellen activeren en wat de geactiveerde NK cellen vervolgens gaan doen. De pluimvee virussen waar in dit project mee gewerkt zal worden (MDV, IBV) hebben enorme economische gevolgen voor de pluimvee industrie. Meer kennis over hoe deze virussen het vroege afweer systeem aanzetten kan leiden tot de ontwikkeling van nieuwe vaccins.

Daarnaast kan de kennis over de NK response in de kip na infectie met deze pluimvee virussen leiden tot een beter begrip van de antivirale immuun response in mensen. IBV heeft veel overeenkomsten met het humane severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS). Het oncogene herpesvirus MDV lijkt sterk op het Epstein-Barr virus wat voor grote problemen zorgt in mensen met een verzwakt afweer systeem zoals transplantatie patiënten. Daarnaast wordt MDV gebruikt als vector voor recombinante vaccins. Dus effectieve strategieën tegen deze pluimvee virussen kunnen ook van belang zijn voor de humane vaccin industrie.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Aanpak:

1. Leghennen worden geïnfecteerd met virus
2. op verschillende tijdpunten na infectie worden de kippen doodgemaakt. Relevante organen worden verzameld.
3. op het lab worden NK cellen geïsoleerd en wordt de NK cel response gemeten

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

IBV

Om de IBV-specifieke NK cellen te bestuderen zullen drie weken oude leghennen geïnfecteerd worden met levend IBV virus of worden gevaccineerd. Op verschillende tijdpunten na infectie zullen de longen, milt en bloed worden verzameld voor de isolatie van leukocyten. In het lab zal de aanwezigheid en de activiteit van de NK cellen gemeten worden met behulp van flow cytometry. De hoeveelheid virus in de longen zal worden bepaald door middel van qPCR.

MDV

1 week oude SPF leghennen zullen worden geïnfecteerd met MDV vaccin, of verschillende MDV virussen. Doorgaans worden 1 dag oude leghennen geïnfecteerd met MDV omdat deze zeer gevoelig zijn voor het virus. Eerder onderzoek waarin de ontwikkeling van de NK cel response in leghennen bestudeerd is (AVD108002016712) heeft echter laten zien dat in deze zeer jonge kuikens de hoeveelheid NK cellen in ed verschillende organen zeer laag is. Hierdoor is het niet mogelijk is om voldoende NK cellen te isoleren voor de analyse. In overleg met professor [REDACTED] die wekelijks dit soort *in vivo* experimenten doet is ervoor gekozen om 1 week oude leghennen te gebruiken en de dosis virus te verhogen.

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

De overeenkomst tussen alle experimenten is de isolatie van de NK cellen. Omdat het om verschillende virussen en vaccins gaat, zullen ze allemaal onderzocht worden. Wanneer een IBV vaccin geen NK cel activiteit induceert, hoeft dat niet te betekenen dat een MDV vaccin ook geen NK cellen aanzet.

Milestone 1: het bestuderen van de NK cel activiteit na infectie met IBV

Milestone 2: het bestuderen van de NK cel activiteit na vaccinatie met IBV

Milestone 3: het bestuderen van de NK cel activiteit na infectie met MDV

Milestone 4: het bestuderen van de NK cel activiteit na vaccinatie met MDV

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

Volgnummer	Type dierproef
1	IBV infectie en vaccinatie
2	MDV infectie en vaccinatie
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Format

Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Bestudering van de natural killer response na virusinfecties in kippen
1.2 Looptijd van het project	1 september 2017- 1 september 2020
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	kippen, virusinfectie, natural killer cel, afweer

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	De pluimveeindustrie probeert virusinfecties bij kuikens vooral te voorkomen door vaccinatie van de kuikens en door medicijnen aan het voer toe te voegen. Het is van groot belang verstandig met deze medicijnen om te gaan, vanwege het gevaar voor antibioticaresistentie. Daarom onderzoeken we betere manieren om kuikens te beschermen tegen infectieziektes. Wanneer virale infecties beter onder controle zijn, zullen er minder bacteriële infecties optreden en is er dus minder antibiotica gebruik nodig om deze secundaire infecties te bestrijden. Het doel van dit project is om activiteit van kippen NK-cellen (natural killer-cellen) te bestuderen nadat de kippen besmet zijn met een virus. NK-cellen hebben als belangrijkste taak het doden van cellen die besmet zijn met een virus. Daarnaast zetten ze ook de vervolgreactie van het afweer system in
---	---

gang.

In eerdere studies hebben we aangetoond dat milde luchtweginfecties in kippen ervoor zorgen dat de NK cellen in de longen worden geactiveerd. Hoe de virussen de NK cellen aanzetten is nog niet bekend. Wanneer we beter begrijpen hoe virussen NK cellen activeren, kunnen we strategieën gaan ontwikkelen om de NK cel te sturen en op deze manier kuikens beter te beschermen tegen infectieziekten.

Het doel van dit project is om te onderzoeken hoe twee verschillende virussen en daarvan afgeleide vaccins NK cellen activeren en antwoord te krijgen op de vraag of deze virussen en vaccins eenzelfde manier gebruiken om NK cellen te activeren of dat elk virus zijn eigen specifieke methode heeft. In dit project zal de NK cel response bestudeerd worden na een luchtweginfectie in kippen en na infectie met een kippen herpesvirus.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

We verwachten de eigenschappen van de NK na infecties met de verschillende pluimvee virussen en na vaccinatie met vaccins voor deze virussen in kaart te kunnen brengen. Het verschil in NK activiteit na infecties versus vaccinatie zal aantonen of ook verzwakte virussen (vaccins) in staat zijn om NK cellen te activeren. Dit is belangrijk voor toekomstig onderzoek, als vaccins een vergelijkbare NK celactiviteit kunnen induceren als levende virussen, kunnen in de toekomst kippen gevaccineerd worden in plaats van geïnfecteerd wat leidt tot minder ongerief bij de dieren. Wanneer duidelijk wordt of verschillende virussen eenzelfde of juist verschillende methodes gebruiken om NK cellen te activeren kan deze kennis worden toegepast in de ontwikkeling van strategieën om NK cellen zo te activeren dat ze nog beter in staat zijn om virussen te bestrijden en op deze manier kippen te beschermen tegen een virusinfectie.

De pluimvee virussen waar in dit project mee gewerkt zal worden (MDV, IBV) hebben enorme economische gevolgen voor de pluimvee industrie. Meer kennis over hoe deze virussen het vroege afweersysteem aanzetten kan leiden tot de ontwikkeling van nieuwe vaccins.

Daarnaast kan de kennis over de NK response in de kip na infectie met deze pluimvee virussen leiden tot een beter begrip van de antivirale immuun response in mensen. IBV heeft veel overeenkomsten met het humane severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS). Het oncogene herpesvirus MDV lijkt sterk op het Epstein-Barr virus wat voor grote problemen zorgt in mensen met een verzwakt afweersysteem, zoals transplantatie patiënten. Daarnaast wordt MDV gebruikt als vector voor recombinante vaccins. Dus effectieve strategieën tegen deze pluimvee virussen kunnen ook van belang zijn voor de humane vaccin industrie.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Legkipkuikens; 205

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Een deel van de kippen wordt geïnfecteerd met een virus dat luchtweginfecties veroorzaakt. Als gevolg van de toediening van het virus dat, behalve de toediening, geen ziekteverschijnselen veroorzaakt, kunnen de kippen het gedurende enkele minuten wat benauwd hebben en ziekteverschijnselen zoals kuchen en rochelen vertonen.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Dierproef 1 (80 kuikens): 75% licht, 25% matig ongerief
Dierproef 2 (125 kuikens): 100% licht ongerief

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De kippen worden doodgemaakt om de organen die relevant zijn voor het afweersysteem te kunnen bestuderen. Het is niet mogelijk om deze organen uit levende dieren te halen.

4 Drie V's

4.1 Vervanging

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Voor onderzoek naar het afweersysteem is het noodzakelijk om cellen te gebruiken die kort daarvoor uit het dier zijn gehaald. Er zijn computerprogramma's waarmee we meer kennis op het gebied van het afweersysteem kunnen verkrijgen, maar deze zijn er niet voor het afweersysteem van de kip. Vandaar dat voor onderzoek naar de functie van de afweercellen van de kip het nog steeds noodzakelijk is om materiaal te gebruiken uit dieren.

4.2 Vermindering

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Op basis van eerdere studies deze is berekend hoe groot de groepen moeten zijn om in dit project een effect van luchtweginfecties stoffen op de NK activiteit te kunnen meten. Op basis van deze data en een studie uit de literatuur is een schatting gemaakt van de groepsgrootte voor experimenten met het kippen herpesvirus. Op deze manier worden zo min mogelijk dieren gebruikt.

4.3 Verfijning

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diertype model(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

We maken gebruik van legkippen, omdat dit de kippen zijn die ook gehouden worden in de pluimvee industrie. Op een commercieel pluimvee bedrijf worden deze dieren herhaaldelijk gevaccineerd in de eerste weken van hun leven, dus dit zijn de dieren waarvoor nieuwe strategieën om kuikens te beschermen tegen infectieziekten het meest relevant zijn.

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

De kippen worden gehuisvest op rubberen roosters en krijgen warmtelampen om ervoor te zorgen dat ze het warm genoeg hebben. Voeren lichtregimes worden toegepast zoals ook van toepassing in een commerciële setting. Dagelijks worden de kippen gecontroleerd op welzijn. Kippen worden gedood indien ziekteverschijnselen worden geconstateerd die duiden op ernstig ongerief.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr><tr><td>3.4.4.1</td><td>Bestuderen van de IBV specifieke NK cel response in kippen na infectie of vaccinatie</td></tr></table>	Volgnummer	Type dierproef	3.4.4.1	Bestuderen van de IBV specifieke NK cel response in kippen na infectie of vaccinatie
Volgnummer	Type dierproef					
3.4.4.1	Bestuderen van de IBV specifieke NK cel response in kippen na infectie of vaccinatie					

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Drie weken oude leghennen worden geïnfecteerd met IBV-M41, of gevaccineerd met de IBV vaccins H52 of H120. Op 1, 2 en 4 dagen na infectie/ vaccinatie worden de kippen doodgemaakt, relevante organen zoals long, milt en bloed worden verzameld. In het lab worden uit de verschillende organen de leukocyten geïsoleerd voor verder onderzoek.

De keuze voor de tijdstippen waarop de kippen gedood worden is bepaald nav eerdere experimenten met IBV-M41 waarin er een verhoogde NK cel activiteit in de long optreedt op 1 dag na infectie, op dag 2 neemt de NK cel activiteit af en op dag 4 is de verhoogde NK cel activiteit niet meer aanwezig (Vervelde *et al*, Vet Immunol Immunopathol 2013). Voor levend M41 zou meten op dag 1 en dag 4 voldoende zijn gebaseerd op eerdere resultaten, omdat het effect van IBV vaccinatie op NK activiteit niet eerder is bestudeerd wordt dag 2 ook meegenomen zodat ook de kinetiek van de vaccin geïnduceerde NK response bestudeerd kan worden.

Primaire uitkomst parameters:

- De frequentie van NK cellen gemeten met behulp van markers voor kippen NK cellen
- De activiteit van NK cellen (bepaling van de expressie van CD107, een eiwit wat op de buitenkant van geactiveerde NK cellen zit; productie van IFN γ .)

Secundaire uitkomstparameters: cytokines (IFN α / β / γ), virale load.

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

!8 dagen bebroede eieren worden gekocht en verder uitgebroed in de broedmachines. Op dag 21 komen de kuikens uit het ei. De kuikens worden vervolgens in

isolatoren gehuisvest en op dag 21 wordt virus of vaccin toegediend dmv intratracheale (i.t.) en intra-nasale(i.t.) toediening, dit duurt ongeveer 5 minuten per kip De toediening gebeurt zowel intra-tracheaal als intra-nasaal om ervoor te zorgen dat er voldoende virus of vaccin aanwezig is.-Op verschillende tijdstippen worden de kippen doodgemaakt door elektrische bedwelmig gevolgd door verbloeding.

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

Het effect van IBV infectie op de NK activiteit eerder beschreven (Vervelde *et al*, Vet Immunol Immunopathol 2013).

Op basis van resultaten uit deze studie kan de groepsgrootte berekend worden:

Controle groep 2.7% geactiveerde NK cellen, IBV geïnfecteerde groep 13.9% geactiveerde NK cellen met een SD van resp 0.9% en 3.3% (beide uitkomst variabelen continu). In combinatie met een onderscheidend vermogen van 90% en een alfa van 5% komt de groepsgrootte op $n=5$, dus 5 kippen per groep.

Per behandeling is er een dag 0 (moment voor infectie), dag 1, dag 2 en dag 4 na infectie dus 4 tijdstippen x5 dieren is 20 dieren

Groep 1: PBS

Groep 2: IBV M41

Groep 3: IBV vaccin H52

Groep 4: IBV vaccin H120

Vier behandelingsgroepen x 20 dieren is 80 kippen

B. De dieren

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

80 leghenkuikens afkomstig van een commerciële broederij. Er is gekozen voor het gebruik van kippen die ook in de praktijk gebruikt worden zodat er zo dicht mogelijk bij de praktijk situatie gebleven wordt. Er is voor leghennen gekozen omdat de lange termijn verbetering van de afweer response waar we in dit project aan gewerkt wordt mn van belang is voor leghennen aangezien vleeskuikens maar kort leven.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

Voor het testen van de activiteit van het vroege afweer systeem is het noodzakelijk om cellen vers uit een dier te verkrijgen. Inzicht verkrijgen in immuun responsen kan deels middels computermodellen, echter voor de kip zijn computermodellen van immuun responsen nog niet beschikbaar. Het meten van de daadwerkelijk functionele activiteit dient nog steeds getest te worden met levende cellen.

Voor IBV zijn alle vaccin en virusstammen uit de aanvraag relevant voor de praktijk. IBV is een respiratoir

virus in pluimvee. Het virus infecteert de epitheliale cellen van de bovenste luchtwegen en afhankelijk van het tropisme ook epitheel cellen van nieren en oviduct.

In het verleden is door ons *in vivo* onderzoek gedaan naar de NK response na infectie met de IBV veldstam M41. Dit resulteerde in de bevinding dat de NK cel response in de longen verhoogd is na IBV infectie.

Nu is de onderzoeksvraag of IBV vaccins in staat zijn om eenzelfde activiteit in long NK cellen te induceren als de veldstam M41. Het is niet mogelijk om deze vraag uitsluitend met testen in het lab te beantwoorden, omdat het technisch niet mogelijk is om epitheliale cellen van de luchtwegen uit een kip te isoleren, te kweken en te infecteren met IBV. Ook is het niet duidelijk welke populatie NK cellen uit de kip gehaald zouden moeten om de IBV geïnduceerde activiteit van long NK cellen te kunnen meten.

Er zijn experimenten gedaan waarin geprobeerd is om long NK cellen te activeren door deze te kweken in de aanwezigheid van virus maar dit is nooit gelukt. Dit is dus in tegenstelling met de verhoogde NK activiteit in kippen een dag na IBV infectie.

Vermindering:

De groepsgrootte is bepaald op basis van eerdere studies met levens IBV in kippen.

Verfijning:

De dieren worden in een groep gehuisvest, onder een warmtelamp en hebben onbeperkt toegang tot voedsel en water

De leggen is het doeldier binnen dit project, waardoor de uitkomsten makkelijk vertaalbaar zijn naar de uiteindelijke toepassing in de praktijk.

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

1. De dieren worden in groepen gehouden in een omgeving die in ieder geval aansluit bij hun basisbehoeften wat betreft management van klimaat, licht, strooisel, voer en watervoorziening.
2. Het welzijn en de gezondheid van de dieren wordt elke dag gecontroleerd. Hierdoor worden eventuele welzijnsaantastingen snel gesignaleerd en kan snel worden ingegrepen door aanpassingen in het management, een passende behandeling of euthanasie..

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

nvt

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

kortdurende benauwdheid (minder dan 30 sec) als gevolg van intratracheale inoculatie; niezen, proesten, lichte benauwdheid.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

intratracheale toediening van het virus kan een kortdurende benauwdheid veroorzaken (dus het gevolg van de toediening), het virus kan milde verschijnselen geven zoals niezen, proesten, rochelen en een lichte benauwdheid

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

de inoculatie zorgvuldig maar binnen zo kort mogelijke tijd uitvoeren, verschijnselen van intratracheale toediening van IB zijn niet te voorkomen.

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

- Er is een kleine kans dat kippen het humane eindpunt bereiken.
Wij achten het noodzakelijk om de kuikens te euthanaseren indien deze niet meer in staat zijn zelfstandig het voer en/of drinkwater tot zich te nemen of ernstig ziek zijn (bol zitten, apathie)

- Humane eindpunten kippen:
 - 1. Uiterlijk:
 - 0 = normaal;
 - 1 = onverzorgde veren;
 - 2 = oedeem en zwelling van de kop, het ooglid of de schenkel;
 - 3 = abnormale houding;

- 2. Gedrag:
- 0 = normaal;
- 1 = kleine veranderingen;
- 2 = verminderde activiteit;
- 3 = immobiliteit;
-
- 3. Lichaamsgewicht:
- 0 = normaal;
- 1 = mager (~10% gewichtsverlies);
- 2 = zeer mager (~20% gewichtsverlies);
- 3 = broodmager (>20% gewichtsverlies);
-

Het humane eindpunt wordt bereikt als een of meer kritische parameters gelijk of hoger is dan 3.

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

< 1% (in eerder experimenten met IBV heeft inoculatie niet geleid tot het bereiken van een humaan eindpunt, de verschijnselen na inoculatie waren zoals verwacht: niezen, proesten en lichte benauwdheid)

K. Classificatie van ongerief

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

het uitkomen van eieren: licht ongerief

labelen van de kuikens dmv wingtags: licht ongerief

doodmaken: licht ongerief

IBV inoculatie: licht ongerief

Ziekteverschijnselen als gevolg van IBV inoculatie: matig ongerief

Cumulatief ongerief: licht (75% van de dieren), matig (25% van de dieren)

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Voor het onderzoek zijn cellen uit organen nodig. het is niet mogelijk deze organen te isoleren uit levende dieren

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

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

☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table> <tr> <th>Volgnummer</th> <th>Type dierproef</th> </tr> <tr> <td>3.4.4.2</td> <td>Bestuderen van de MDV specifieke NK cel response in kippen na infectie of vaccinatie</td> </tr> </table>	Volgnummer	Type dierproef	3.4.4.2	Bestuderen van de MDV specifieke NK cel response in kippen na infectie of vaccinatie
Volgnummer	Type dierproef					
3.4.4.2	Bestuderen van de MDV specifieke NK cel response in kippen na infectie of vaccinatie					

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Een week oude SPF legkippen worden intra abdominaal geïnfecteerd met wild type MDV RB-1B, mutanten van MDV RB-1B, of MDV vaccin CVI988. Op 1, 4, 7 en 10 dagen na infectie/ vaccinatie worden de kippen doodgemaakt en worden relevante organen zoals thymus, milt en bloed verzameld. In het lab worden uit de verschillende organen de leukocyten geïsoleerd voor verder onderzoek.

De keuze voor de tijdstippen waarop de kippen gedood worden is bepaald nav eerdere experimenten met deze MDV virussen waarin gekeken is naar de aanwezigheid van virus in het bloed. De virus titer in bloed neemt sterk toe tot 10 dagen na infectie (Greco *et al*, J. Virol 2014). De NK cel activiteit na infectie met deze virussen is niet eerder bepaald, maar gezien het feit dat NK cellen betrokken zijn bij de eerste afweer reactie wordt de NK activiteit verwacht in deze periode. Door op verschillende momenten de NK cel activiteit te bepalen kan ook de kinetiek van de response in kaart worden gebracht.

Primaire uitkomst parameters:

- Percentage van NK cellen gemeten met behulp van markers voor kippen NK cellen
- De activiteit van NK cellen (bepaling van de expressie van CD107, een eiwit wat op de buitenkant van geactiveerde NK cellen zit; productie van IFN γ .)

Secundaire uitkomstparameters: cytokines (IFN α /β/γ), virale load en percentages T cellen.

MDV is een celgebonden virus wat gekweekt wordt op chicken embryonic fibroblasts (CEF). Wanneer er gesproken wordt over een MDV vaccinatie of een MDV infectie zullen er dus geïnfecteerde CEF worden toegediend. Als negatieve controle zullen niet geïnfecteerde CEF ingespoten worden. Naast de virulente MDV stam RB1B zullen ook twee mutante virussen bestudeerd worden. Een van deze virussen mist het

belangrijke oncogen meq. Studies door de groep van professor █████ hebben aangetoond dat infectie met RB1B delta meq leidt tot een betere bescherming tegen hoog pathogene MDV virussen in vergelijking met commerciële vaccins. Het is de vraag of NK cellen een rol spelen in dit proces. Het andere virus mist zowel het oncogen meq als vIL8. IL-8 is een signaal stof die ervoor zorgt dat B en T cellen naar de plek van MDV infectie gaan (Engel *et al*, J. Virol 2012) waar ze geïnfecteerd kunnen worden met MDV. De lytische infectie die volgt leidt tot een afname van de hoeveelheid lymfocyten en is een van de mogelijke oorzaken van de immuunsuppressie door MDV. De verwachting is dat RB1B delta █████ delta █████ leidt tot een betere bescherming (het delta meq effect) en een verminderde immuun suppressie (het █████ effect). De rol van NK cellen in deze processen zal bestudeerd worden na infectie met dit virus.

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

18 dagen bebroede SPF eieren worden gekocht van een Europese leverancier voor SPF eieren en verder uitgebroed in de broedmachines. Op dag 21 komen de kuikens uit het ei. De kuikens worden vervolgens in isolatoren gehuisvest en op dag 6 eenmaal geïnfecteerd/ gevaccineerd met MDV. MDV wordt intra abdominaal toegediend, ongeveer 2 minuten per kip. Op verschillende tijdstippen worden de kippen doodgemaakt door cervicale dislocatie of wanneer ze meer wegen dan 250 gram elektrische bedwelming gevolgd door verbloeding.

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

Het effect van MDV infectie op de NK activiteit is in de jaren 80 eerder beschreven (Sharma *et al*, Avian Diseases 1981). In deze studie werd gekeken naar verschil in NK activiteit tussen kippen die verschillen in MHC, waar met 5 kippen per groep verschillen in NK activiteit konden worden aangetoond tussen MHC ingeteelde kippen.

Het doel van de huidige studie is om de NK response na infectie met verschillende MDV virussen en een MDV vaccin te bestuderen in SPF leghennen. Daarnaast zijn de huidige NK assays zijn gevoeliger dan de assays uit de studie van Sharma *et al*, en wordt in onze studie in andere organen en op andere tijdstippen gemeten. Omdat in deze studie andere assays worden gebruikt om de NK activiteit te meten wat het lastig maakt om data uit deze studie te gebruiken voor een berekening van de van de groepsgrootte.

Uit de studie van Sharma *et al* kan worden geconcludeerd dat een groepsgrootte van 5 dieren genoeg is om een mogelijk verschil in NK activiteit aan te kunnen tonen. Op basis hiervan zal in deze studie een pilot worden uitgevoerd met 5 dieren per groep voor de verschillende MDV virussen en het vaccin.

Per virus is er een dag 0 (moment voor infectie), dag 1, 4, 7 en 10 5 tijdstippen x 5 dieren is 25 dieren

Dag 4, 7 en 10 zijn gekozen in overleg met een MDV onderzoeker uit Duitsland omdat uit studies in zijn groep gebleken is dat op die tijdstippen virus gedetecteerd kan worden. Dag 1 is gebaseerd op eerder onderzoek naar virus geïnduceerde NK activiteit. Zowel voor IBV als voor influenza is er een verhoogde NK activiteit gemeten op 1 dag na infectie. De hypothese is dat op dag 10 de NK activiteit weer op basaal niveau is, maw dat de virus geïnduceerde NK activiteit weer voorbij is. Dus de tijdstippen zijn zo gekozen dat ook de kinetiek van de MDV geïnduceerde NK activiteit bestudeerd kan worden.

Groep 1: negatieve controle (ongeïnfecteerde CEF)

Groep 2: RB1B (WT MDV)

Groep 3: RB1B delta █████ delta █████

Groep 4: RB1B delta █████

Groep 5: Rispens CVI988 (vaccin)

vijf behandelingsgroepen x 25 dieren is 125 kippen

B. De dieren

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

125 SPF legkuikens van 6 dagen oud. Er is gekozen voor legkippen omdat de lange termijn verbetering van de afweer response waar in dit project aan gewerkt wordt mn van belang is voor leghennen aangezien vleeskuikens maar kort leven. In het onderzoek naar MDV worden doorgaan SPF dieren gebruikt. Omdat we zoveel mogelijk aan willen sluiten bij eerder onderzoek waarin gekeken is naar virus titers en bescherming is er gekozen om de eerste studies naar het effect van MDV op de Nk cell response in SFP kuikens te doen.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

Voor het testen van de activiteit van het vroege afweer systeem is het noodzakelijk om cellen vers uit een dier te verkrijgen. Inzicht verkrijgen in immuun responsen kan deels middels computermodellen, echter voor de kip zijn computermodellen van immuun responsen nog niet beschikbaar. Het meten van de daadwerkelijk functionele activiteit dient nog steeds getest te worden met levende cellen.

De huidige MDV vaccins beschermen tegen ziekte maar niet tegen infectie. Dit betekent dat kippen in de pluimvee industrie wel geïnfecteerd worden met het virus, en de praktijk leert dat de MDV virussen sinds de invoering van MDV vaccinatie in 1970 steeds virulenter worden. Een mogelijke oorzaak voor het feit dat vaccinatie niet beschermt tegen infectie, is dat de huidige MDV vaccins het afweer systeem onderdrukken waardoor het virus niet volledig wordt opgeruimd (Nair *et al*, Vet. J. 2005)

Een ideaal MDV vaccin beschermt dus niet alleen tegen ziekte maar ook tegen infectie. Een hypothese is dat wanneer het lukt om een MDV vaccin te maken wat het afweersysteem niet onderdrukt, het virus wel wordt opgeruimd door een goed functionerend afweer systeem. De mutante virussen die in dit onderzoek gebruikt worden hebben mogelijk deze potentie.

CVI988: een van de huidige vaccins die onderdrukking van het afweer systeem veroorzaakt

RB-1B: een goed gekarakteriseerde MDV stam die al decennia lang gebruikt wordt in het MDV onderzoek

RB-1B mutanten: MDV virussen die mogelijk het immuun systeem niet onderdrukken: nieuwe kandidaat vaccins voor de toekomst.

CVI988 en de RB-1B mutante virussen zijn relevant voor de veterinaire praktijk, de RB-1B is indirect relevant omdat de vergelijking tussen wildtype en mutanten zal laten zien of er inderdaad een verschil is in afweerreactie en hoeveelheid virus na toediening van de mutante virussen in vergelijking tot de wildtype.

Testen in het lab hebben reeds aangetoond dat MDV embryonale NK cellen kan activeren. Deze in vitro assays zijn geen vervanging van de dierproef omdat in een dier verschillende populaties NK cellen voorkomen en het nog niet duidelijk is welke daarvan belangrijk zijn bij virale infecties. In de fysiologische situatie zullen ook cytokines gemaakt door geïnfecteerde epitheel cellen of andere cellen van het immuunsysteem een rol spelen. Dit kan niet worden nagebootst in een reageerbuis.

Vermindering:

Het aantal kippen wat gebruikt gaat worden in deze pilot studie is gebaseerd op eerdere studies waarin gekeken is naar NK cellen in MHC ingeteelde kippen.

Verfijning:

De dieren worden in een groep gehuisvest, onder een warmtelamp en hebben onbeperkt toegang tot voedsel en water.

De leghen is het doeldier binnen dit project, waardoor de uitkomsten makkelijk vertaalbaar zijn naar de uiteindelijke toepassing in de praktijk.

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

1. De dieren worden in groepen gehouden in een omgeving die in ieder geval aansluit bij hun basisbehoeften wat betreft management van klimaat, licht, strooisel, voer en watervoorziening.
2. Het welzijn en de gezondheid van de dieren wordt elke dag gecontroleerd. Hierdoor worden eventuele welzijnsaantastingen snel gesignaleerd en kan snel worden ingegrepen door aanpassingen in het management, een passende behandeling of euthanasie..

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

nvt

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen. MDV kan leiden tot verlammingen verschijnselen en veroorzaakt tumoren. Dit gebeurt niet binnen de korte termijn na MDV infectie waarvan hier sprake is. Doorgaans beginnen deze verschijnselen ongeveer 4 weken na infectie.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

- Er is een kleine kans dat kippen het humane eindpunt bereiken.
Wij achten het noodzakelijk om de kuikens te euthanaseren indien deze niet meer in staat zijn zelfstandig het voer en/of drinkwater tot zich te nemen of ernstig ziek zijn (bol zitten, apathie)

- Humane eindpunten kippen:
 - 1. Uiterlijk:
 - 0 = normaal;
 - 1 = onverzorgde veren;
 - 2 = oedeem en zwelling van de kop, het ooglid of de schenkel;
 - 3 = abnormale houding;
 - 2. Gedrag:
 - 0 = normaal;
 - 1 = kleine veranderingen;
 - 2 = verminderde activiteit;
 - 3 = immobiliteit;
 - 3. Lichaamsgewicht:
 - 0 = normaal;
 - 1 = mager (~10% gewichtsverlies);
 - 2 = zeer mager (~20% gewichtsverlies);
 - 3 = broedmager (>20% gewichtsverlies);

Het humane eindpunt wordt bereikt als een of meer kritische parameters gelijk of hoger is dan 3.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?
< 1%
K. Classificatie van ongerief
Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.
het uitkomen van eieren: licht ongerief
labelen van de kuikens dmv wingtags: licht ongerief
doodmaken: licht ongerief
MDV inoculatie: licht ongerief
Cumulatief ongerief: licht (100% van de dieren)

Einde experiment

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2017.II.811.020
2. Titel van het project : Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen
3. Titel van de NTS : Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen

4. Type aanvraag:

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

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht
Telefoonnummer contactpersoon : XXXXXXXXXX
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ☒ ontvangen door DEC: 02-06-2017
☐ aanvraag compleet: 14-06-2017
☒ in vergadering besproken:
☐ anderszins behandeld:
☒ termijnonderbreking(en) van / tot : 21-06-2017/17-07-2017 en 24-07-2017/28-07-2017
☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
☐ aanpassing aanvraag:
☒ advies aan CCD: 03-08-2017

7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 21-06-2017
- Datum antwoord: 17-07-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: De DEC vraagt zich af of de experimenten niet geheel of gedeeltelijk in vitro kunnen plaatsvinden om de keuze voor de virussen beter te onderbouwen en het aantal benodigde dieren te verminderen. Ook vraagt de DEC zich af wat voor in vitro onderzoek al is gedaan; de voorgeschiedenis mist.

In de kip is nog relatief weinig bekend over NK cellen. Het is niet bekend hoe belangrijk de omgeving (bv signaalstoffen zoals cytokinen gemaakt door andere cellen) is voor de virus geïnduceerde activiteit van NK cellen of dat alleen de interactie van een virus en een NK cel voldoende is. Daarnaast is er in de kip geen marker die op alle NK cellen tot expressie komt. Er zijn wel verschillende NK cel subsets beschreven in verschillende organen van de kip, maar omdat de markers voor kippen NK cellen nog niet goed gekarakteriseerd zijn is het nog niet mogelijk om de vergelijking met zoogdieren te maken. Al deze factoren zorgen ervoor dat het op dit moment niet mogelijk is om in vivo NK studies te vervangen door in vitro experimenten. Het is totaal niet duidelijk hoe het in vitro werk zich verhoudt tot wat er in vivo gebeurt. Als een embryonale NK cel reageert in een in vitro assays, zegt dat niks over wat een long NK cel gaat doen na een respiratoire infectie. Het doel van deze aanvraag is juist om beter te gaan begrijpen hoe virussen NK cellen activeren, zodat het in de toekomst mogelijk is om in vivo proeven gedeeltelijk te vervangen door in vitro werk. Ook bevat deze aanvraag naast levende virussen studies met vaccins. Wanneer deze experimenten laten zien dat virussen en vaccins een vergelijkbaar effect hebben op de kippen NK cellen, kunnen in de toekomst vaccins gebruikt worden in eventuele in vivo proeven om zo het ongerief van de dieren te verminderen. Dit is nu uitgebreider beschreven in de aanvraag.

In vitro onderzoek heeft plaats gevonden voor MDV virus zoals reeds beschreven in 3.1 "In vitro tests laten een verhoogde NK cel activiteit zien wanneer NK cellen 24 uur lang gekweekt zijn in aanwezigheid van MDV. In deze experimenten zijn NK cellen gekweekt in aanwezigheid van MDV vaccin en virussen die ook in de aanvraag beschreven staan". De vaccin stam induceerde een milde verhoging van de NK activiteit in vitro en de NK activiteit nam meer toe na incubatie met het virus RB-1B. In vitro onderzoek met IBV heeft ook plaatsgevonden, maar tot op heden is het niet gelukt om NK cellen geïsoleerd uit kippen te activeren door een co-kweek met IBV. Dit is in tegenstelling tot de in vivo experimenten die wel een verhoogde NK activiteit laten zien (Vervelde, DCI 2012)). Deze in vitro resultaten zijn nu toegevoegd aan de aanvraag.

- 3.1 Achtergrond: De DEC adviseert u een figuur toe te voegen waarin de andere (CCD goedgekeurde) projecten vermeld staan en de relatie met dit nieuwe project duidelijk wordt.
Deze figuur is gemaakt en toegevoegd aan de aanvraag.
- 3.1 Achtergrond: De DEC raadt u aan persoonsnamen uit de aanvraag te verwijderen.
Dit is aangepast.
- 3.2 Doel: De DEC ziet niet hoe u het hoofddoel wilt bereiken/beantwoorden met de voorgestelde proeven. Het is m.b.t. IBV geen mechanistisch onderzoek, maar beschrijvend

onderzoek. Het doel dient anders geformuleerd te worden. De DEC adviseert u aan om van de subdoelen het hoofddoel te maken.

Dit is aangepast.

Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: U zegt: *"De kuikens worden vervolgens in isolatoren gehuisvest en op dag 21 eenmaal geïnfecteerd/ gevaccineerd met IBV. IBV inoculatie van zowel levend virus als vaccin gebeurt d.m.v. intratracheale (i.t.) en intra-nasale(i.t.) toediening, dit duurt ongeveer 5 minuten per kip."* Indien het om levend-verzwakte vaccins gaat betreft het een infectie en geen vaccinatie.

Dit is nu aangepast, in de huidige versie staat er "De kuikens worden vervolgens in isolatoren gehuisvest en op dag 21 wordt virus of vaccin toegediend d.m.v. intratracheale (i.t.) en intranasale (i.t.) toediening, dit duurt ongeveer 5 minuten per kip".

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Het is de DEC niet helder of de wijze van toediening, intra-tracheaal en intra-nasaal, beiden gebeurt of dat een van de toedieningsvormen wordt gebruikt. Graag verhelderen.

De toediening gebeurt zowel intra-tracheaal als intra-nasaal om ervoor te zorgen dat er voldoende virus of vaccin aanwezig is.

Dit is aangepast.

- D. Vervanging, vermindering en verfijning: U heeft testen in het lab die NK-cellen kunnen activeren, maar is het effect van IBV en MDV al onderzocht en hoe zit het met de verschillen in beschikbare vaccins? Graag nader toelichten. Zie het eerste punt van 3.1 achtergrond.

Dit is ook op deze plaats in de aanvraag nu uitgebreider toegelicht.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum vragen: 24-07-2017

- Datum antwoord: 28-07-2017

- Gestelde vragen en antwoorden:

- Bijlage 2: De DEC heeft nog een vraag m.b.t. de proefopzet. Hierin wordt aangegeven dat: *"Een week oude SPF legkippen worden intra abdominaal geïnfecteerd met wild type MDV RB-1B, mutanten van MDV RB-1B, of gevaccineerd met het commerciële MDV vaccin CVI988."* Wordt het MDV Rispen vaccin CVI988 subcutaan toegediend (volgens registratie uitsluitend subcutane toepassing) of wordt dit ook intra-abdominaal toegepast? Herpesvirussen vertonen soms een totaal ander infectiepatroon wanneer de wijze van inoculatie wordt veranderd (vgl ADV intranasaal, intramusculair en subcutaan). Zijn zaken vergelijkbaar als voor een verschillende wijze van inoculatie gekozen wordt? Er lijken "niet vergelijkbare groepen" te ontstaan. Graag verhelderen.
In dit geval wordt CVI988 ook intra abdominaal toegediend, juist om de toedieningsroute vergelijkbaar te houden met de andere MDV virussen. Dit stond inderdaad niet duidelijk in de aanvraag en is nu veranderd in : "Een week oude SPF legkippen worden intra

abdominaal geïnfecteerd met wild type MDV RB-1B, mutanten van MDV RB-1B of CVI988.” De intra-abdominale toediening van CVI988 is eerder uitgevoerd door collega’s in Duitsland die zeer regelmatig MDV infectieproeven in kippen uitvoeren met verschillende MDV virussen. Een intra abdominale toediening van CVI988 levert geen problemen op. Vandaar dat in overleg met hen gekozen is voor deze aanpak.

- D. Vervanging, vermindering en verfijning: De DEC is nog niet tevreden met uw toelichting op de vraag over de testen in het lab. De keuze voor de verschillende vaccins/virusstammen is nog onvoldoende toegelicht, waardoor de ratio van de verschillende groepen niet navolgbaar is. Zijn bijvoorbeeld alle vaccins/virusstammen relevant zijn voor de veterinaire praktijk? Graag nog nader toelichten.

Bijlage 1 IBV:

Voor IBV zijn alle vaccin en virusstammen relevant voor de praktijk. IBV is een respiratoir virus in pluimvee. Het virus infecteert de epitheliale cellen van de bovenste luchtwegen en afhankelijk van het tropisme ook epitheel cellen van nieren en oviduct.

In het verleden is door ons in vivo onderzoek gedaan naar de NK response na infectie met de IBV veldstam M41. Dit resulteerde in de bevinding dat de NK cel response in de longen verhoogd is na IBV infectie.

In een eerdere CCD aanvraag kwam de vraag van de DEC of het niet mogelijk was om IBV vaccin stammen te gebruiken i.p.v. de IBV veldstam, omdat dit minder ongerief bij de dieren oplevert. Mijn antwoord toen was dat de NK response na toediening van IBV vaccin stammen zoals H52 en H120 nog nooit gemeten is, en dat het niet mogelijk is om dit te voorspellen omdat het mechanisme achter de IBV geïnduceerde NK activiteit niet duidelijk is.

In deze aanvraag komt de onderzoeksvraag of IBV vaccins in staat zijn om eenzelfde activiteit in long NK cellen te induceren als de veldstam M41. Het is niet mogelijk om deze vraag uitsluitend met testen in het lab te beantwoorden, omdat het technisch niet mogelijk is om epitheliale cellen van de luchtwegen uit een kip te isoleren, te kweken en te infecteren met IBV. Ook is het niet duidelijk welke populatie NK cellen uit de kip gehaald zouden moeten om de IBV geïnduceerde activiteit van long NK cellen te kunnen meten.

Er zijn experimenten gedaan waarin geprobeerd is om long NK cellen te activeren door deze te kweken in de aanwezigheid van virus maar dit is nooit gelukt. Dit is dus in tegenstelling met de verhoogde NK activiteit in kippen een dag na IBV infectie.

Omdat het niet mogelijk is om deze vraag in het lab te beantwoorden (wat ook de voorkeur zou hebben van de onderzoeker omdat dat minder dieren maar ook minder tijd en geld kost) is deze aanvraag geschreven om het effect van IBV en IBV vaccins op de activiteit van long NK cellen te onderzoeken.

Bijlage 2 MDV:

De huidige MDV vaccins beschermen tegen ziekte maar niet tegen infectie. Dit betekent dat kippen in de pluimvee industrie wel geïnfecteerd worden met het virus, en de praktijk leert dat de MDV virussen sinds de invoering van MDV vaccinatie in 1970 steeds virulenter worden. Een mogelijke oorzaak voor het feit dat vaccinatie niet beschermt tegen infectie, is

dat de huidige MDV vaccins het afweer systeem onderdrukken waardoor het virus niet volledig wordt opgeruimd (Nair V. Evolution of Marek's disease – a paradigm for incessant race between the pathogen and the host. Vet. J. 2005;170:175–183).

Een ideaal MDV vaccin beschermt dus niet alleen tegen ziekte maar ook tegen infectie. Een hypothese is dat wanneer het lukt om een MDV vaccin te maken wat het afweersysteem niet onderdrukt, het virus wel wordt opgeruimd door een goed functionerend afweer systeem. De mutante virussen die in dit onderzoek gebruikt worden hebben mogelijk deze potentie.

CVI988: een van de huidige vaccins die onderdrukking van het afweer systeem veroorzaakt
RB-1B: een goed gekarakteriseerde MDV stam die al decennia lang gebruikt wordt in het MDV onderzoek

RB-1B mutanten: MDV virussen die mogelijk het immuun systeem niet onderdrukken: nieuwe kandidaat vaccins voor de toekomst.

CVI988 en de RB-1B mutante virussen zijn relevant voor de veterinaire praktijk, de RB-1B is indirect relevant omdat de vergelijking tussen wildtype en mutanten zal laten zien of er inderdaad een verschil is in afweerreactie en hoeveelheid virus na toediening van de mutante virussen in vergelijking tot de wildtype.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Pluimvee wordt tegen virusinfecties beschermd middels vaccinaties en door medicijnen in het voer. Medicatie in het voer kan echter leiden tot antibioticaresistentie en wordt om die reden meer en meer aan banden gelegd. De focus komt derhalve steeds meer te liggen op vaccinaties die de afweer verbeteren. Om hiertoe effectieve vaccins te ontwerpen is het van essentieel belang om te begrijpen hoe het afweersysteem pathogenen bestrijdt. Het afweersysteem bestaat uit twee delen, het innate (oftewel het aangeboren) en het adaptieve afweersysteem. Een belangrijke component van het

innate afweersysteem zijn de zogenaamde “natural killer” (NK) cellen welke worden geacht een belangrijke bijdrage te leveren aan de afweer tegen virus infecties. Daarnaast zijn NK cellen belangrijk in het initiëren van de adaptieve afweer respons die vervolgens op gang komt. De ontwikkeling van NK cellen bij kippen is echter nog onvoldoende onderzocht. Het is bekend dat bepaalde virussen in staat zijn om NK cellen in de kip te activeren, maar hoe en waar de virussen de kippen NK cellen aanzetten is nog niet duidelijk. Tevens is niet bekend of NK cellen uitsluitend geactiveerd worden door levende virussen, of dat ook (geïnactiveerde) vaccin stammen leiden tot een verhoogde NK cel activiteit en of verschillende virussen elk hun eigen ‘strategie’ hebben om NK cellen aan te zetten, of dat er een uniform mechanisme is waardoor de NK cel wordt aangezet tijdens een virale infectie. Met behulp van het voorliggende project wil de aanvrager de NK activiteit bestuderen na infectie met verschillende pluimvee virussen en na vaccinatie met verschillende pluimvee vaccins. De focus zal liggen op twee economisch relevante pluimvee virussen, namelijk het respiratoire virus IBV en het Marek’s Disease Virus (MDV), een kippen herpesvirus. De relatie tussen het hoofddoel en de subdoelen komt overeen met voorbeeld 4B uit de ‘Handreiking Invulling Definitie Project’.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling(en).

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is 1) vaststellen of er een verschil is in NK activiteit na toediening van IBV virus of IBV vaccins en 2) het meten van de NK activiteit in de kip na infectie met verschillende MDV virussen. Het uiteindelijke doel van het project is het ontwikkelen van strategieën om de NK cel te sturen en zodoende kuikens beter te beschermen tegen infectieziekten. De DEC is van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, het veld van onderzoek, het doeldier namelijk kuikens/kippen en mogelijk de industrie die de NK cel stimulerende middelen produceert. Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en mogelijk pijn ervaren. De dieren zullen in het kader van het onderzoek gedood worden. De proefdieren zijn tevens doeldieren en voor hen geldt dat dit project een bijdrage zal leveren aan het ontwikkelen van een doeltreffende therapie ter bescherming tegen infectieziekten, wat het welzijn en de rechtvaardigheid bevordert. Voor het onderzoeksveld geldt dat dit project kan bijdragen aan een goede wetenschappelijke reputatie en kan leiden tot nieuwe wetenschappelijke inzichten. Belanghebbenden zijn indirect ook de samenleving en humane patiënten omdat kennis over de NK response in de kip na infectie met de pluimvee virussen MDV en IBV ook kan leiden tot een

beter begrip van de antivirale immuun response in mensen. Daarnaast zou de ontwikkeling van nieuwe vaccins het gebruik van antibiotica (virus infecties plaveien de weg voor bacteriële infecties) in de pluimvee industrie kunnen terugbrengen en daarmee het ontstaan van resistentie.

6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De onderzoeksgroep doet sinds 2007 onderzoek naar kippen NK cellen en er wordt nauw samengewerkt met een onderzoeksgroep uit München die al meer dan 30 jaar onderzoek doet naar kippen NK cellen en naar NK cel receptoren. Het onderzoek naar MDV wordt uitgevoerd in nauwe samenwerking met onderzoeksgroepen in Duitsland en de UK die veel expertise hebben op het gebied van MDV. De DEC is er daarom van overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De DEC is er bovendien van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project zal kunnen voldoen aan de 3V-beginselen om te voorkomen dat teveel proefdieren zullen worden ingezet en dat ze onnodig nadeel zullen ondervinden van de experimenten.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De opzet van beide bijlagen is in de basis gelijk. In bijlage 1 wordt de NK cel respons na infectie of vaccinatie met IBV en in bijlage 2 na infectie of vaccinatie met MDV bestudeerd. In bijlage 1 worden hiertoe drie weken oude leghennen geïnfecteerd met een levend IBV virus of gevaccineerd met twee IBV vaccins en in bijlage 2 met een MDV vaccin, of verschillende MDV virussen. Op verschillende tijdstippen na infectie/vaccinatie worden de kippen doodgemaakt en worden relevante organen zoals thymus, milt en bloed verzameld. In het lab worden uit de verschillende organen de leukocyten geïsoleerd voor verder onderzoek. Er zit geen go/no go tussen het gebruik van virus en vaccin of beide bijlagen; omdat het om verschillende virussen en vaccins gaat zullen ze allemaal onderzocht worden. De primaire uitkomst parameters in de bijlagen zijn hetzelfde: de frequentie van NK cellen gemeten met behulp van markers voor kippen NK cellen en de NK cel activiteit. DEC is overtuigd dat de strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
 - ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
 - ☐ Dieren in/uit het wild (10f)

- ☐ Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
- ☐ Zwerfdieren (10h)
- ☐ Hergebruik (1e lid 2)
- ☐ Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- ☐ Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- ☐ Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.
11. In bijlage 1 is het cumulatieve ongerief voor 75% van de dieren ingeschat als licht, ten gevolge van het uitkomen van de eieren, het labelen van de kuikens d.m.v. wingtags, de IBV inoculatie en het doden van de dieren. De ziekteverschijnselen als gevolg van de IBV inoculatie kunnen matig ongerief veroorzaken. De verwachting is dat dit bij 25% van de dieren zal gebeuren. In bijlage 2 is het cumulatieve ongerief voor alle dieren ingeschat als licht. Dit wordt veroorzaakt door het uitkomen van de eieren, het labelen van de kuikens d.m.v. wingtags en de MDV inoculatie en het doden van dieren. De DEC is van mening dat het hierboven beschreven cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd.
12. De integriteit van de dieren uit beide bijlagen wordt fysiek aangetast door het aanbrengen van zg. wingtags, hetgeen een lichte ingreep is en kan de intratracheale inoculatie van het IBV virus (bijlage 1) leiden tot niezen, proesten en lichte benauwdheid.
13. De humane eindpunten zijn voor de twee bijlagen goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is in beide bijlagen minder dan 1 % hetgeen naar de mening van de DEC realistisch is. De welzijnsscore wordt uitgevoerd met een beproefd systeem voor kuikens/kippen. Op basis van de ervaring dat in eerdere experimenten inoculatie met het IBV virus niet heeft geleid tot het bereiken van het humane eindpunt acht de DEC de inschatting van minder dan 1% ook voor de dieren die geïnoculeerd worden met het MDV virus realistisch.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Voor het testen van de activiteit van het vroege afweer systeem zijn cellen uit een vers gedood dier nodig. Computermodellen van de immuun response van de kip zijn (nog) niet beschikbaar. In bijlage 1 is de onderzoeksvraag of IBV vaccins in staat zijn om eenzelfde activiteit in long NK cellen te induceren als de veldstam M41. Het is niet mogelijk om deze vraag uitsluitend met *in vitro* testen te beantwoorden, omdat het technisch niet mogelijk is om epitheliale cellen van de luchtwegen uit een kip te isoleren, te kweken en te infecteren met IBV. Wat betreft bijlage 2 is *in vitro* reeds aangetoond dat MDV embryonale NK cellen kan activeren. Deze *in vitro* assays zijn echter geen vervanging van de dierproef omdat in een dier

verschillende populaties NK cellen voorkomen en het nog niet duidelijk is welke daarvan belangrijk zijn bij virale infecties. In de fysiologische situatie zullen ook cytokines, gemaakt door geïnfecteerde epitheelcellen of andere cellen, van het immuunsysteem een rol spelen. Dit kan niet *in vitro* worden nagebootst. Om de doelstelling van dit project te kunnen behalen zijn dus *in vivo* experimenten noodzakelijk.

15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Bij de schatting van het aantal benodigde dieren is uitgegaan van een groepsgrootte van maximaal 5 kippen, omdat uit eerder vergelijkbaar onderzoek is gebleken dat een dergelijke groepsgrootte voldoende groot is om statistisch en biologisch significante verschillen tussen groepen aan te tonen.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er wordt gebruik gemaakt van leghennen omdat het doel van het project met name van belang is voor leghennen, die langer leven dan vleeskuikens, en de onderzoeker hiermee zo dicht mogelijk bij de praktijksituatie blijft.
Er worden naast levende virussen ook experimenten met vaccins uitgevoerd. Wanneer deze experimenten laten zien dat virussen en vaccins een vergelijkbaar effect hebben op de kippen NK cellen, kunnen in de toekomst vaccins gebruikt worden in eventuele *in vivo* proeven om zo het ongerief van de dieren te verminderen.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. In beide bijlagen wordt gewerkt met leghenkuikens omdat dit de doeldieren zijn. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken, noodzakelijk is om de proeven met alleen leghenkuikens uit te voeren.
19. De dieren in beide bijlagen worden in het kader van het project gedood omdat uit de verschillende organen de leukocyten geïsoleerd worden voor verder onderzoek. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood.
20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk vaststellen of er een verschil is in NK activiteit na toediening van IBV virus of IBV vaccins en het meten van de NK activiteit in de kip na infectie met verschillende MDV virussen, met als ultieme doel de afweer tegen infectieziekten in kippen te versterken, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.
2. Er vindt een beperkte tot aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats met, voor 75% van de dieren, licht en, voor 25% van de dieren, matig ongerief. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er toe bijdragen dat meer inzicht verkregen wordt in hoe virussen NK cellen activeren en kunnen onderzoekers strategieën gaan ontwikkelen om de NK cel te sturen en op deze manier kuikens/kippen beter beschermen tegen infectieziekten. Dit zal er toe bijdragen dat het dierenwelzijn van kippen verbeterd. De DEC kent hier veel gewicht aan toe. Als resultante van het slagen van dit project moet ook worden genoemd dat het antibiotica gebruik in de pluimveehouderij dan teruggebracht zou kunnen worden, hetgeen voor de gemeenschap en voor humane patiënten een groot voordeel biedt, omdat antibiotica resistentie dan mogelijk beter onder controle te brengen is. Het is aannemelijk dat de fundamentele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Dat het voor de individuele onderzoeker van belang kan zijn om aansprekende onderzoeksresultaten te boeken is juist, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC daar weinig gewicht aan toe.
3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat de belangen voor het onderzoeksgebied, voor het welzijn van kuikens/kippen in de pluimveehouderij en voor de gemeenschap opwegen tegen de beperkte tot aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - ☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
 - ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.
 - ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht/ Instantie voor Dierenwelzijn
Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1080020172905

Bijlagen

2

Datum 8 augustus 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 8 augustus 2017. Het gaat om uw project "Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1080020172905. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

8 augustus 2017

Aanvraagnummer:

AVD1080020172905

Datum:
8 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020172905

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10800
Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht/ Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 30275924
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
IBAN: NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

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

Datum:

8 augustus 2017

Aanvraagnummer:

DEC080020172905

Over uw project

Geplande startdatum:

1 oktober 2017

Geplande einddatum:

1 oktober 2020

Titel project:

Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen

Titel niet-technische samenvatting:

Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen

Naam DEC:

DEC Utrecht

Postadres DEC:

Postbus 85500 3508 GA Utrecht

E-mailadres DEC:

dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 1.287,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- ☒ Projectvoorstel
☒ Beschrijving Dierproeven
☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- ☒ DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

Utrecht

Datum:

7 augustus 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Postbus 80.011
3508 TA UTRECHT


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1080020172905
Bijlagen
2

Datum 8 augustus 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 8 augustus 2017
Vervaldatum: 7 september 2017
Factuurnummer: 172905
Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1080020172905	€ 1.287,00

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

Universiteit Utrecht/ Instantie voor Dierenwelzijn
Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1080020172905

Datum 15 augustus 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 8 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen" met aanvraagnummer AVD1080020172905. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin 3.1 en 3.2 minder technisch en met voor een leek begrijpelijk taalgebruik zijn beschreven?

Onder 4.3 schrijft u 'Kippen worden gedood indien ziekteverschijnselen worden geconstateerd die duiden op ernstig ongerief.' Uit de aanvraag blijkt echter niet dat er sprake is van ernstig ongerief. Kunt u dit anders verwoorden zodat het in overeenstemming is met de aanvraag?

Leges

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

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

Opsturen binnen veertien dagen

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

Datum:

15 augustus 2017

Aanvraagnummer:

AVD1080020172905

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlagen:

- Melding bijlagen
- Niet technische samenvatting



Melding bijlagen

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

1 Uw Gegevens

Naam instelling: Universiteit Utrecht/ Instantie voor Dierenwelzijn
Utrecht

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD1080020172905

2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?

Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

☐ Projectvoorstel

☐ Beschrijving Dierproeven

☐ Niet-technische samenvatting

☐ Melding Machtiging

☐ Aanvraagformulier

☐

☐

☐

Datum:

15 augustus 2017

Aanvraagnummer:

AVD1080020172905

3 Ondertekening

Naam:

Datum: - -

Handtekening:

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401

2500 EK Den Haag



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht/ Instantie voor Dierenwelzijn
Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD1080020172905

Bijlagen

1

Datum 12 september 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 8 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen" met aanvraagnummer AVD1080020172905. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 31 augustus 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof een nieuwe NTS.

Beslissing

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

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

U kunt met uw project "Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 oktober 2017 tot en met 1 oktober 2020.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 3 augustus 2017. 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:
12 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020172905

Bezwaar

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven

namens deze:



Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Utrecht/ Instantie voor Dierenwelzijn
Utrecht

Adres: Postbus 12007

Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT

Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 oktober 2017 tot en met 1 oktober 2020, voor het project "Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen" met aanvraagnummer AVD1080020172905, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. 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 8 augustus 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 8 augustus 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 augustus 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 3 augustus 2017, ontvangen op 8 augustus 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 31 augustus 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Bestuderen van de IBV specifieke NK cel response in kippen na infectie of vaccinatie				
	Kippen / leghennen	80	25% Matig 75% Licht	
3.4.4.2 Bestuderen van de MDV specifieke NK cel response in kippen na infectie of vaccinatie				
	Kippen /	125	Licht	

Aanvraagnummer:

AVD1080020172905

Voorwaarden

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

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:

AVD1080020172905

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:

AVD1080020172905

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

Einde van een dierproef

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

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

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.