	Inventaris Wob-verzoek W17-09								
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2017838								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud				x			x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud				x			x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud				x			x	
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
10	Reactie aanvulling aanvraag				x		x	x	
11	Bijlage beschrijving dierproeven 1 nieuw				x			x	
12	Bijlage beschrijving dierproeven 2 nieuw				x			x	
13	Bijlage beschrijving dierproeven 3 nieuw				x			x	
14	Advies CCD		x						x
15	Beschikking en vergunning				x		x	x	

1.

22 FEB. 2017

Centrale Commissie Dierproeven

AVD401002017 838

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?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

☒ Ja > *Vul uw deelnemernummer in* 40100
☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	Stichting Wageningen Research	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]	
KvK-nummer	908104	
Straat en huisnummer	Akkermaalsbos	12
Postbus	59	
Postcode en plaats	6700AB	Wageningen
IBAN	NL10RABO0397066465	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR	

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	☐ Dhr. ☒ Mw.
Functie	[redacted]	
Afdeling	[redacted]	
Telefoonnummer	[redacted]	
E-mailadres	[redacted]	

1.5 *(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	☐ Dhr. ☒ Mw.
Functie		
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 Melding Machtiging mee met deze aanvraag*	
		☒ Nee	

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	1 - 5 - 2017
		Einddatum	29 - 4 - 2022
3.2	Wat is de titel van het project?	In ovo vaccinatie Infectieuze bronchitis virus in kippen	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	In ovo vaccinatie Infectieuze bronchitis virus 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-WUR
		Postadres	Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen
		E-mailadres	DEC@wur.nl

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1541 Lege

☐ Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.

☐ Via een eenmalige incasso

☒ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel +-3 bijlagen

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

☒ bestelorder WUR1037550

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	[redacted]
Functie	[redacted]
Plaats	Wageningen
Datum	20 - 2 - 2017
Handtekening	[redacted]

2.

Form
Project proposal

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research
1.3	Provide the title of the project.	In ovo vaccinatie Infectieuze bronchitis virus in kippen

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

[] Basic Research
[X] Translational or applied research
[X] Regulatory use of routine production
[] Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
[] Research aimed at preserving the species subjected to procedures

[] Higher education or training
[] Forensic enquiries
[] Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Infectieuze bronchitis virus (IBV) is zeer besmettelijk en veroorzaakt o.a. luchtweg problemen en nier/oviduct beschadigingen in kippen, tevens vermindert het de eiproductie in legkippen. De enige manier om deze ziekte in pluimvee te voorkomen is door vaccinatie. Verschillende vaccins tegen een brede variatie van serotypen van IB zijn commercieel verkrijgbaar en worden over het algemeen via een spray toegediend bij kuikens met een leeftijd van 1 dag oud. Het is belangrijk dat kippen op een jonge leeftijd beschermd worden omdat deze het meest vatbaar zijn voor de ziekte en bovendien bevinden de oviducts en nieren zich nog in de ontwikkelingsfase. Tegenwoordig zijn er vaccins verkrijgbaar die worden toegediend aan 19-daagse bebroede eieren. Deze vaccinatie methode (*in ovo* vaccinatie) wordt voornamelijk gebruikt voor de ziekte van Marek, maar is ook erg aantrekkelijk voor andere pluimvee ziekten vooral omdat het resulteert in een erg vroege bescherming. Een ander voordeel is dat met behulp van gespecialiseerde apparatuur vele duizenden eieren tegelijktijdig gevaccineerd kunnen worden met dezelfde dosis vaccin. Daarom is er een uitgebreid onderzoeksplan opgezet om *in-ovo* IBV vaccins te testen op werkzaamheid en deze studies worden uitgevoerd volgens de Europese farmacopee monograaf. Een farmacopee is een officieel, van staatswege uitgegeven handboek met voorschriften voor de bereiding van geneesmiddelen voor menselijk en dierlijk gebruik, en de vereisten waaraan zij moeten voldoen.
In een eerdere aanvraag [redacted] zijn verschillende vaccin [redacted] getest, waarvan [redacted] kandidaten succesvol met beschermingspercentages tegen infectie met IBV van [redacted] deze resultaten zijn verkregen met de ciliostasis test zoals beschreven in de Europese farmacopee (EP). De richtlijn van de EP stelt dat vaccins voldoen als een beschermingspercentage hoger dan 80% wordt behaald.
De huidige aanvraag betreft een vervolg in het testen van vaccin kandidaten die sterk lijken op de eerder geteste succesvolle kandidaten en welke slechts verschillen door de [redacted] in het [redacted] gen. Het doel van de huidige aanvraag is het uitgebreid testen van deze gerepareerde vaccin kandidaten. De proeven zijn verplicht voor productregistratie en gebaseerd op de Europese farmacopee. De Europese Farmacopee (Ph. Eur.) heeft op het Nederlandse grondgebied rechtskracht, zowel voor humane als veterinaire geneesmiddelen.
In dit project worden de minimale dosering, de werkzaamheid in dieren met maternale immuniteit en de duur van immuniteit van de vaccin-kandidaten getest.

In het eerste experiment wordt de dosering van de vaccin kandidaten getest om een beeld te krijgen van de minimale dosis nodig voor bescherming, dit wordt gedaan in SPF eieren. Aan de hand van deze resultaten worden vaccin kandidaten geselecteerd om te testen in eieren afkomstig van dieren met antistoffen tegen IBV, in deze te vaccineren embryo's zijn maternale antistoffen aanwezig. Omdat de uiteindelijke *in-ovo* vaccinatie zal plaatsvinden in conventionele bebroede eieren, zijn de resultaten van deze proef zeer relevant. Er zal worden gevaccineerd met een dosis vaccin die gerelateerd is aan het eerste experiment.
In het derde experiment wordt de duur van de immuniteit getest op beste vaccin-kandidaat/kandidaten uit de tweede proef. In de eerste proef zijn de dieren op een leeftijd van 21 dagen gechallenged en in deze derde proef zal de tijd tussen vaccinatie en challenge verlengd worden naar 42 en 56 dagen leeftijd. Om deze resultaten goed te kunnen vergelijken met experiment 1 worden er wederom SPF eieren gevaccineerd.
Er zal worden getest op de volgende parameters; uitkomst percentage, gezondheid van de kuikens, serologie en bescherming na een IBV infectie. De uitleesparameter van de bescherming is de ciliostasis test, deze staat beschreven in de europese farmacopee. Kort samengevat; de beweging van de cilia (trilharen) in de trachea wordt microscopisch bekeken en gescoord. Er worden per trachea 10 ringen beoordeeld (3 onder, 4 midden en 3 boven). De score per ring is 0 indien 50% of meer van de cilia in de ring bewegen en 1 indien minder dan 50% van de cilia bewegen. Een dier wordt beschouwd als beschermd als in 9 van de 10 ringen de cilia beweging 50% of meer is.

3.2 Purpose

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

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

Het doel van het project is om de werkzaamheid van [redacted] vaccin kandidaten te testen als een in-ovo vaccin. De bescherming van deze vaccins worden getest in een challenge model. De haalbaarheid van dit project wordt als goed ingeschat, mede door ervaring vanuit de eerdere aanvraag. Er is expertise opgebouwd van zowel het challenge model als van de ciliostasis test.

3.3 Relevance

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

Vaccin toediening via de *in-ovo* route is veiliger en niet belastend voor het doeldier. De vaccinatie is effectiever omdat elk dier de juiste dosis ontvangt, in tegenstelling tot spray vaccinatie waar meer variatie in het ontvangen van het vaccin mogelijk is. Tevens levert de *in-ovo* vaccinatie geen extra stress op voor het dier na de uitkomst uit het ei in tegenstelling tot andere vaccinatie-methoden.

3.4 Research Strategy

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

De strategie is om werkzaamheid van diverse *in-ovo* vaccin-kandidaten te testen volgens de richtlijnen aangegeven in de Europese farmacopee. Deze testen zijn noodzakelijk voor productregistratie.

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

In dit project worden de minimale dosering (experiment 1), de werkzaamheid in dieren met maternale immuniteit (experiment 2) en de duur van immuniteit (experiment 3) van de vaccin-kandidaten getest.

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

In dit project worden de minimale dosering, de werkzaamheid in dieren met maternale immuniteit en de duur van immuniteit van de vaccin-kandidaten getest.
In het eerste experiment wordt de dosering van de vaccin kandidaten getest om een beeld te krijgen van de minimale dosis nodig voor bescherming, dit wordt gedaan in SPF eieren.
Tweede experiment: Aan de hand van deze resultaten worden vaccin kandidaten geselecteerd [redacted] om te testen in eieren afkomstig van dieren met antistoffen tegen IBV, in deze te vaccineren embryo's zijn maternale antistoffen aanwezig. Omdat de uiteindelijke *in-ovo* vaccinatie zal plaatsvinden in conventionele bebroede eieren, zijn de resultaten van deze proef zeer relevant. Er zal worden gevaccineerd met een dosis vaccin die gerelateerd is aan het eerste experiment.
In het derde experiment wordt de duur van de immuniteit getest op beste vaccin-kandidaat/kandidaten [redacted] uit de tweede proef. In de eerste proef zijn de dieren op een leeftijd van 21 dagen gechallenged en in deze derde proef zal de tijd tussen vaccinatie en challenge verlengd worden naar 42 en 56 dagen leeftijd. Om deze resultaten goed te kunnen vergelijken met experiment 1 worden er wederom SPF eieren gevaccineerd.
Er zal worden getest op de volgende parameters; uitkomst percentage, gezondheid van de kuikens, serologie en bescherming na een IBV infectie.
De uitleesparameter van de bescherming is de ciliostasis test, deze staat beschreven in de europese farmacopee. Kort samengevat; de beweging van de cilia (trilharen) in de trachea wordt microscopisch bekeken en gescoord. Er worden per trachea 10 ringen beoordeeld (3 onder, 4 midden en 3 boven). De score per ring is 0 indien 50% of meer van de cilia in de ring bewegen en 1 indien minder dan 50% van de cilia bewegen. Een dier wordt beschouwd als beschermd als in 9 van de 10 ringen de cilia beweging 50% of meer is.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	testen van de minimale dosering vaccin kandidaat voor bescherming in SPF kippen.

Serial number	Type of animal procedure
2	testen van de werkzaamheid in dieren met maternale immuniteit ook volgens de EP monograaf.
3	testen van de duur van de bescherming, met een challenge op 6 weken na vaccinatie en een challenge 8 weken na vaccinatie.

4.

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure testen van de minimale dosering vaccin kandidaat voor bescherming in SPF kippen.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

De 19-daagse bebroede eieren worden *in-ovo* gevaccineerd met 2 verschillende doseringen van [redacted] IBV vaccin-[redacted] tezamen met een placebo vaccinatie (1 controlegroep).
In totaal worden er op deze manier [redacted].
De *in-ovo* vaccinatie wordt uitgevoerd in een [redacted] dierruimte per groep en in dezelfde ruimte worden de eieren uitgebroed. Zodra de eieren uitkomen wordt het uitkomst percentage bepaald en de gezondheid van de kuikens wordt geïnspecteerd en worden ze in beide vleugels gemerkt met een uniek nummer per dier. De kuikens worden vervolgens gedurende 21 dagen dagelijks verzorgd en geobserveerd. Op de leeftijd van 21 dagen wordt een serum-bloedmonster afgenomen om de immuunstatus van het dier te bepalen. Tevens worden de dieren geïnfecteerd (challenge) met IBV virus via oogdruppeling. Na de challenge worden de dieren gedurende 5 dagen 2x per dag klinisch geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de kippen geëuthanaseerd en worden tijdens de sectie de trachea's (luchtpijp) microscopisch onderzocht (ciliostase test) zoals voorgeschreven in de Europese farmacopee (pg. 721). De aan- of afwezigheid van bewegende cilia (trilharen) in de trachea geven de mate van bescherming aan. Zijn de cilia intact dan is een gevaccineerd dier beschermd tegen het challenge virus. Bij de controle dieren die niet gevaccineerd zijn cilia niet meer intact. Via een score-systeem wordt de mate van bescherming vastgesteld.

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

De in-ovo vaccinatie wordt 1 maal toegepast, het vaccin wordt in het 19-daags bebroede ei gespoten bij voorkeur in het embryo (in minstens 50% van de eieren per groep). Indien de injectienaald het embryo niet kan bereiken (dat is te voelen) heeft dit tot gevolg dat het vaccin in de amnion holte zal terechtkomen. In voorgaande proeven leek er [redacted] waarin er [redacted] voorkwam bij de [redacted] eieren. [redacted]
Na de uitkomst worden de dieren dagelijks verzorgd en geobserveerd. Als de kuikens 21 dagen oud zijn wordt er een bloedmonster genomen om de antilichaamsrespons gericht tegen het vaccin-virus vast te stellen. Door randomisatie worden 20 dieren per groep geselecteerd voor de challenge met IBV virus, deze challenge wordt gedaan via oogdruppeling. De dieren worden vervolgens gedurende vijf dagen 2x daags verzorgd en klinische geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de dieren geëuthanaseerd.

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

In de Europese farmacopee Avian infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2) staat beschreven dat per vaccingroep niet minder dan 20 dieren moeten worden gebruikt voor het vaccinatie/challenge experiment.
Echter omdat hier begonnen wordt met bebroede eieren, is ervoor gekozen om met 30 eieren per groep te starten. Hiermee wordt ondervangen dat voor de uiteindelijke effectiviteitsstudie (challenge) te weinig kuikens beschikbaar zijn, waardoor het experiment ongeldig zou zijn. In ovo vaccinatie wordt veelvuldig toegepast en geeft weinig embryo verliezen. In een kleinschalig experiment moet er echter altijd rekening mee gehouden worden dat door toeval in een groep meer embryonale sterfte optreedt dan gemiddeld. Embryonale sterfte kan optreden als gevolg van toeval (niet gerelateerd aan de in ovo vaccinatie), maar ook door de in ovo vaccinatie (door het mechanische proces of als gevolg van het IBV vaccin).
De bebroede eieren worden dagelijks geschouwd, dit betekent dat mbv een lamp wordt gekeken of het embryo nog leeft.

Ervaring uit eerdere proeven:
[redacted] vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van [redacted] tot slechts [redacted]
[redacted] vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van [redacted]
[redacted] keer controle groep([redacted]): uitkomstpercentages [redacted]
Uitval tijdens opgroei-periode tot leeftijd 21 dagen varieerde van [redacted] dieren per groep.
Euthanasie door randomisatie op dag van challenge:
Totaal zijn er in de geteste [redacted] groepen, [redacted] dieren geëuthanaseerd op 21 dagen leeftijd.
In geval van de groep met uitkomst van [redacted] en uitval van [redacted] dieren betekende het dat slechts [redacted] dier voor de challenge geëuthanaseerd moest worden.
Bovenstaande geeft aan dat een start met 30 eieren een realistische inschatting geeft om het beoogde aantal van 20 dieren voor challenge te behalen.

B. The animals

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

Er worden kuikens (leghennen of broilers) gebruikt die uit SPF eieren zijn uitgebroed.
Er worden maximaal 90 stuks bebroede eieren per experiment gebruikt. Het experiment bestaat uit [redacted] groepen eieren ([redacted] in twee groepen wordt het vaccin toegediend in twee verschillende doseringen en de derde groep betreft de ongevaccineerde [redacted] controle groep. In totaal zullen er op deze manier [redacted] vaccinkandidaten getest worden en dat betekent dus dat er in totaal [redacted] bebroede eieren gebruikt zullen worden. Indien alle eieren per experiment (=1 vaccin kandidaat) uitkomen is er sprake van 90 kippen (totaal van [redacted] De challenge met het IBV virus op de leeftijd van 21 dagen wordt uitgevoerd op 20 dieren per groep. De overige dieren (surplus) worden door randomisatie uit de proef gehaald en geëuthanaseerd. De dieren die gechallenged zijn zullen op een leeftijd van 26 dagen of eerder (indien ernstige kliniek) worden geëuthanaseerd.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

[X] No, continue with question D.
[] Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

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

[] No
[] Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging: kip is het doeldier, vervanging is niet mogelijk omdat er geen in-vitro systeem bestaat om bescherming aan te tonen. Vermindering: Er wordt uitgegaan van de Europese farmacopee infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2), waarin staat aangegeven dat er minimaal 20 dieren voor een vaccinatie/challenge experiment gebruikt moeten worden. Om te voorkomen dat het experiment ongeldig wordt door een te hoge embryonale sterfte en uitval na uitkomst wordt begonnen met 30 eieren. Bij uitval van 30% eieren/kuikens (ook een maat voor veiligheid van het vaccin) kan dan nog steeds de effectiviteit op een valide manier worden bepaald. Verfijning: De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

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

De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Er is geen sprake van herhaling van het testen van eenzelfde vaccin kandidaat. De uitvoering van de proef is als vermeldt in [redacted] echter nu wordt [redacted] vaccin kandidaat getest per experiment met twee verschillende doseringen. Er worden maximaal [redacted] vaccinkandidaten getest.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

[X] No
[] Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

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

[] No > Continue with question H.
[X] Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

[] No > Continue with question I.
[X] Yes > Will anaesthesia, analgesiaor other pain relieving methods be used?

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Embryonale sterfte, dit betekent het niet uitkomen van de eieren. IBV kliniek; Lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeiing, waterige ogen en benauwdheid

Explain why these effects may emerge.

Embryonale sterfte: mogelijk door in-ovo vaccinatie (door vaccin-virus of schade door injectienaald) of aspecifieke sterfte (geen duidelijke oorzaak)
IBV kliniek: Challenge met IBV virus

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

Door het toepassen van de humane eindpunten

J. Humane endpoints

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

[] No > Continue with question K.
[X] Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

In-ovo vaccinatie is niet pijnlijk, de gezondheid van de kuikens wordt dagelijks en vanaf challenge tot aan het einde van de proef 2x daags geobserveerd mbv een score lijst waarin in IBV ziekteverschijnselen (lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeiing, waterige ogen en ademhaling) staan vermeldt. Elk verschijnsel wordt beoordeeld met een geen (0), milde (1) of ernstige score (2). Het humane eindpunt wordt bereikt bij ernstige benauwdheid (score 2 ademhaling) OF bij een totale score van ≥ 7 bij een tijdsduur van meer dan 2 opeenvolgende dagen. Ervaring vorige dierproeven: [redacted] kliniek in de controle groep, [redacted] gescoord voor maximaal [redacted] dag in [redacted] dieren, in de overige [redacted] dieren geen kliniek gezien. In [redacted] vaccingroep [redacted] in de [redacted] dood [redacted] en [redacted] dier [redacted] dag [redacted]. Dus bovenstaande criteria zijn opgesteld voor een zeer hevige challenge, dit is niet onze ervaring in voorgaande proeven. De ciliostasis test resulteerde in [redacted] in de controle groep, in tegenstelling tot de cilia van de gevaccineerde dieren [redacted]. Dus ondanks de [redacted] is er door deze test [redacted] tussen de beschermde en onbeschermde dieren.

Indicate the likely incidence.

Met inzicht uit vorige proeven: In de vaccin-groepen is de kans 0-20% en in de controle groep 0-50%

K. Classification of severity of procedures

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

De in-ovo vaccinatie: geen ongerief Bloedafname: licht ongerief Challenge: matig ongerief (bij toepassen humane eindpunten) Resulterend in een overall ongerief van matig

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

L. Method of killing

[] No > Continue with Section 3: 'Signatures'.
[X] Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Ciliostase test is een essentieel onderdeel van de proef

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

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

[X] Yes

5.

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure testen van de werkzaamheid in dieren met maternale immuniteit ook volgens de EP monograaf.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In deze studie wordt de werkzaamheid getest in dieren met maternale immuniteit. Hiertoe worden 19-daagse bebroede eieren in-ovo gevaccineerd met meest geschikte vaccin-kandidaten uit studie 1 [redacted] tezamen met een placebo vaccinatie (1 controlegroep).

De experimentele opzet is hetzelfde als studie 1.De *in-ovo* vaccinatie wordt uitgevoerd in een [redacted] dierruimte per groep en in dezelfde ruimte worden de eieren uitgebroed. Zodra de eieren uitkomen wordt het uitkomst percentage bepaald en de gezondheid van de kuikens wordt geïnspecteerd en worden ze in beide vleugels gemerkt met een uniek nummer per dier. De kuikens worden vervolgens gedurende 21 dagen dagelijks verzorgd en geobserveerd. Op de leeftijd van 21 dagen wordt een serum-bloedmonster afgenomen om de immuunstatus van het dier te bepalen. Tevens worden de dieren geïnfecteerd (challenge) met IBV virus via oogdruppeling. Na de challenge worden de dieren gedurende 5 dagen 2x per dag klinisch geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de kippen geëuthanaseerd en worden tijdens de sectie de trachea's (luchtpijp) microscopisch onderzocht (ciliostase test) zoals voorgeschreven in de Europese farmacopee (pg. 721). De aan- of afwezigheid van bewegende cilia (trilharen) in de trachea geven de mate van bescherming aan. Zijn de cilia intact dan is een gevaccineerd dier beschermd tegen het challenge virus. Bij de controle dieren die niet gevaccineerd zijn cilia niet meer intact. Via een score-systeem wordt de mate van bescherming vastgesteld.

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

De in-ovo vaccinatie wordt 1 maal toegepast, het vaccin wordt in het 19-daags bebroede ei gespoten bij voorkeur in het embryo (in minstens 50%). Indien de injectienaald het embryo niet kan bereiken (dat is te voelen) is de consequentie dat het vaccin in de amnion holte zal worden gespoten. In voorgaande proeven leek er een [redacted] waarin er [redacted] voorkwam bij de [redacted] eieren. [redacted] van de eieren als [redacted]
Na de uitkomst worden de dieren dagelijks verzorgd en geobserveerd. Als de kuikens 21 dagen oud zijn wordt er een bloedmonster genomen om de antilichaamsrespons gericht tegen het vaccin-virus vast te stellen. Door randomisatie worden 20 dieren per groep geselecteerd voor de challenge met IBV virus, deze challenge wordt gedaan via oogdruppeling. De dieren worden vervolgens gedurende vijf dagen 2x daags verzorgd en klinische geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de dieren geëuthanaseerd.

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

In de Europese farmacopee Avian infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2) staat beschreven dat per vaccingroep niet minder dan 20 dieren moeten worden gebruikt voor het vaccinatie/challenge experiment.
Echter omdat hier begonnen wordt met bebroede eieren, is ervoor gekozen om met 30 eieren per groep te starten. Hiermee wordt ondervangen dat voor de uiteindelijke effectiviteitsstudie (challenge) te weinig kuikens beschikbaar zijn, waardoor het experiment ongeldig zou zijn. In ovo vaccinatie wordt veelvuldig toegepast en geeft weinig embryo verliezen. In een kleinschalig experiment moet er echter altijd rekening mee gehouden worden dat door toeval in een groep meer embryonale sterfte optreedt dan gemiddeld. Embryonale sterfte kan optreden als gevolg van toeval (niet gerelateerd aan de in ovo vaccinatie), maar ook door de in ovo vaccinatie (door het mechanische proces of als gevolg van het IBV vaccin).
De bebroede eieren worden dagelijks geschouwd, dit betekent dat mbv een lamp wordt gekeken of het embryo nog leeft.

Ervaring uit eerdere proeven:
[redacted] vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van [redacted] tot slechts [redacted]
[redacted] twee vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van [redacted]
[redacted] keer controle groep([redacted]: uitkomstpercentages [redacted]
Uitval tijdens opgroei-periode tot leeftijd 21 dagen varieerde van minimaal [redacted] tot maximaal [redacted] dieren per groep.
Euthanasie door randomisatie op dag van challenge:
Totaal zijn er in de geteste [redacted] groepen, [redacted] dieren geëuthanaseerd op 21 dagen leeftijd.
In geval van de groep met uitkomst van [redacted] en uitval van [redacted] dieren betekende het dat slechts [redacted] dier voor de challenge geëuthanaseerd moest worden.
Bovenstaande geeft aan dat een start met 30 eieren een realistische inschatting geeft om het beoogde aantal van 20 dieren voor challenge te behalen.

B. The animals

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

Er worden kuikens (leghennen of broilers) gebruikt die uit commerciële eieren zijn uitgebroed. De moeder-flock wordt getest op aanwezigheid van antilichamen tegen infectieuze bronchitis (dit is een selectiecriterium voor het gebruik van de eieren voor de proef). Er worden maximaal [redacted] stuks bebroede eieren gebruikt, dit betekent in totaal [redacted] vaccinkandidaten [redacted] en [redacted] controle groep [redacted]
De controle groep bestaat uit [redacted] eieren omdat er [redacted] eieren gereserveerd worden voor het bepalen van de immuunstatus van deze dieren (maternale antilichamen tegen IBV). Na uitkomst zullen er [redacted] kuikens na het nemen van de bloedmonsters niet deelnemen aan de proef en worden geëuthanaseerd. Er worden dus [redacted] eieren uitgebroed alleen voor bloedafname. De dierproef gaat verder met [redacted] eieren/kuikens per groep.

De challenge met het IBV virus op de leeftijd van 21 dagen wordt uitgevoerd op 20 dieren per groep. De overige dieren (surplus*) worden gerandomiseerd uit de proef gehaald en geëuthanaseerd.
De dieren die gechallenged zijn zullen op een leeftijd van 26 dagen of eerder (indien ernstige kliniek) worden geëuthanaseerd. Tijdens sectie wordt de bescherming tegen de challenge getest op trachea's adhv de cilliostase test.
* Surplus dieren: Er zal een evaluatie plaatsvinden na het eerste experiment (bijlage 1) om te bepalen of het aantal surplus dieren (max [redacted] per groep) naar beneden bijgesteld kan worden. Dit zal gebeuren in overleg met de IVD.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

[X] No, continue with question D.
[] Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

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

[] No
[] Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging: kip is het doeldier, vervanging is niet mogelijk omdat er geen in-vitro systeem bestaat om bescherming aan te tonen. Vermindering: Er wordt uitgegaan van de Europese farmacopee infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2), waarin staat aangegeven dat er minimaal 20 dieren voor een vaccinatie/challenge experiment gebruikt moeten worden. Om te voorkomen dat het experiment ongeldig wordt door een te hoge embryonale sterfte en uitval na uitkomst wordt begonnen met 30 eieren. Bij uitval van 30% eieren/kuikens (ook een maat voor veiligheid van het vaccin) kan dan nog steeds de effectiviteit op een valide manier worden bepaald. Verfijning: De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

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

De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te

pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Er is geen sprake van herhaling van het testen van eenzelfde vaccin kandidaat. De uitvoering van de proef is als vermeldt in [redacted] echter nu worden er maximaa[redacted] kandidaten getest en zijn de kuikens afkomstig uit conventionele bebroede eieren.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

[X] No
[] Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

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

[] No > Continue with question H.
[X] Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

[] No > Continue with question I.
[X] Yes > Will anaesthesia, analgesiaor other pain relieving methods be used?

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Embryonale sterfte, dit betekent het niet uitkomen van de eieren. IBV kliniek; Lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeiing, waterige ogen en benauwdheid

Explain why these effects may emerge.

Embryonale sterfte: mogelijk door in-ovo vaccinatie (door vaccin-virus of schade door injectienaald) of aspecifieke sterfte (geen duidelijke oorzaak)
IBV kliniek: Challenge met IBV virus

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

Door het toepassen van de humane eindpunten

J. Humane endpoints

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

[] No > Continue with question K.
[X] Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

In-ovo vaccinatie is niet pijnlijk, de gezondheid van de kuikens wordt dagelijks en vanaf challenge tot aan het einde van de proef 2x daags geobserveerd mbv een score lijst waarin in IBV ziekteverschijnselen (lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeiing, waterige ogen en benauwdheid) staan vermeldt. Elk verschijnsel wordt beoordeeld met een geen (0), milde (1) of ernstige score (2). Het humane eindpunt wordt bereikt bij ernstige benauwdheid (score 2 ademhaling) OF bij een totale score van ≥ 7 bij een tijdsduur van meer dan 2 opeenvolgende dagen. Ervaring vorige dierproeven: [redacted] kliniek in de controle groep, [redacted] gescoord voor maximaal [redacted] dag in [redacted] dieren, in de overige [redacted] dieren geen kliniek gezien. In [redacted] vaccingroep [redacted], in de [redacted] dood [redacted] en [redacted] dier [redacted] dag [redacted]. Dus bovenstaande criteria zijn opgesteld voor een zeer hevige challenge, dit is niet onze ervaring in voorgaande proeven. De ciliostasis test resulteerde in [redacted] in de controle groep, in tegenstelling tot de cilia van de gevaccineerde dieren [redacted]. Dus ondanks de [redacted] is er door deze test [redacted] tussen de beschermde en onbeschermde dieren.

Indicate the likely incidence.

Met inzicht uit vorige proeven: In de vaccin-groepen is de kans 0-20% en in de controle groep 0-50%

K. Classification of severity of procedures

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

De in-ovo vaccinatie: geen ongerief Bloedafname: licht ongerief Challenge: matig ongerief (bij toepassen humane eindpunten) Resulterend in een overall ongerief van matig

End of experiment

L. Method of killing

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

[] No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Ciliostase test is een essentieel onderdeel van de proef

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

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

[X] Yes

6.

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 3	Type of animal procedure testen van de duur van de bescherming, met een challenge op 6 weken na vaccinatie en een challenge 8 weken na vaccinatie.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In dit experiment wordt de duur van bescherming/immuniteit onderzocht aan de hand van een challenge op 6 weken leeftijd en op 8 weken leeftijd, dit in tegenstelling tot de eerdere experimenten waarbij de challenge op een leeftijd van 3 weken uitgevoerd werd.
De verdere proefopzet is verder gelijk aan studie 1.
Er worden 19-daagse bebroede eieren in-ovo gevaccineerd met de meest geschikte vaccin-kandidaten uit studie 1 en 2 tezamen [redacted] met een placebo vaccinatie (1 controlegroep).
De *in-ovo* vaccinatie wordt uitgevoerd in een [redacted] dierruimte per groep en in dezelfde ruimte worden de eieren uitgebroed. Zodra de eieren uitkomen wordt het uitkomst percentage bepaald en de gezondheid van de kuikens wordt geïnspecteerd en worden ze in beide vleugels gemerkt met een uniek nummer per dier. De kuikens worden vervolgens gedurende 21 dagen dagelijks verzorgd en geobserveerd. Op de leeftijd van 21 dagen wordt een serum-bloedmonster afgenomen om de immuunstatus van het dier te bepalen. Tevens worden de dieren geïnfecteerd (challenge) met IBV virus via oogdruppeling. Na de challenge worden de dieren gedurende 5 dagen 2x per dag klinisch geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de kippen geëuthanaseerd en worden tijdens de sectie de trachea's (luchtpijp) microscopisch onderzocht (ciliostase test) zoals voorgeschreven in de Europese farmacopee (pg. 721). De aan- of afwezigheid van bewegende cilia (trilharen) in de trachea geven de mate van bescherming aan. Zijn de cilia intact dan is een gevaccineerd dier beschermd tegen het challenge virus. Bij de controle dieren die niet gevaccineerd zijn cilia niet meer intact. Via een score-systeem wordt de mate van bescherming vastgesteld.

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

De in-ovo vaccinatie wordt 1 maal toegepast, het vaccin wordt in het 19-daags bebroede ei gespoten bij voorkeur in het embryo (in minstens [redacted]. Indien de injectienaald het embryo niet kan bereiken (dat is te voelen) is de consequentie dat het vaccin in de amnion holte zal worden gespoten. In voorgaande proeven leek er [redacted] waarin er [redacted] voorkwam bij de [redacted] eieren. [redacted] van de eieren als [redacted].
Na de uitkomst worden de dieren dagelijks verzorgd en geobserveerd. Als de kuikens 21 dagen oud zijn wordt er een bloedmonster genomen om de antilichaamsrespons gericht tegen het vaccin-virus vast te stellen. Door randomisatie worden 20 dieren per groep geselecteerd voor de challenge met IBV virus, deze challenge wordt gedaan via oogdruppeling. De dieren worden vervolgens gedurende vijf dagen 2x daags verzorgd en klinische geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de dieren geëuthanaseerd.

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

In de Europese farmacopee Avian infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2) staat beschreven dat per vaccingroep niet minder dan 20 dieren moeten worden gebruikt voor het vaccinatie/challenge experiment.
Echter omdat hier begonnen wordt met bebroede eieren, is ervoor gekozen om met 30 eieren per groep te starten. Hiermee wordt ondervangen dat voor de uiteindelijke effectiviteitsstudie (challenge) te weinig kuikens beschikbaar zijn, waardoor het experiment ongeldig zou zijn. In ovo vaccinatie wordt veelvuldig toegepast en geeft weinig embryo verliezen. In een kleinschalig experiment moet er echter altijd rekening mee gehouden worden dat door toeval in een groep meer embryonale sterfte optreedt dan gemiddeld. Embryonale sterfte kan optreden als gevolg van toeval (niet gerelateerd aan de in ovo vaccinatie), maar ook door de in ovo vaccinatie (door het mechanische proces of als gevolg van het IBV vaccin).
De bebroede eieren worden dagelijks geschouwd, dit betekent dat mbv een lamp wordt gekeken of het embryo nog leeft.

Ervaring uit eerdere proeven:
[redacted] vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van [redacted]
[redacted] vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van [redacted]
[redacted] keer controle groep [redacted] uitkomstpercentages [redacted]
Uitval tijdens opgroei-periode tot leeftijd 21 dagen varieerde van minimaal 2 tot maximaal 5 dieren per groep.
Euthanasie door randomisatie op dag van challenge:
Totaal zijn er in de geteste [redacted] groepen, [redacted] dieren geëuthanaseerd op 21 dagen leeftijd.
In geval van de groep met uitkomst van [redacted] en uitval van [redacted] dieren betekende het dat slechts [redacted] voor de challenge geëuthanaseerd moest worden.
Bovenstaande geeft aan dat een start met 30 eieren een realistische inschatting geeft om het beoogde aantal van 20 dieren voor challenge te behalen.

B. The animals

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

Er worden kuikens (leghennen of broilers) gebruikt die uit SPF eieren zijn uitgebroed.
Er worden maximaal 90 stuks bebroede eieren per experiment gebruikt. Het experiment bestaat uit [redacted] in twee groepen wordt het vaccin toegediend en de derde groep betreft de ongevaccineerde [redacted] controle groep, de challenge vindt plaats op twee verschillende tijdstippen. In totaal zullen er op deze manier [redacted] kandidaten getest worden en dat betekent dus dat er in totaal [redacted] bebroede eieren gebruikt zullen worden.
Indien alle eieren per experiment [redacted] uitkomen is er sprake van 90 kippen (totaal van 3x30 eieren per groep). De challenge met het IBV virus op de leeftijd van 21 dagen wordt uitgevoerd op 20 dieren per groep. De overige dieren (surplus*) worden door randomisatie uit de proef gehaald en geëuthanaseerd. De dieren die gechallenged zijn zullen op een leeftijd van 26 dagen of eerder (indien ernstige kliniek) worden geëuthanaseerd.

* Surplus dieren: Er zal een evaluatie plaatsvinden na het eerste experiment (bijlage 1) om te bepalen of het aantal surplus dieren (max 10 per groep) naar beneden bijgesteld kan worden. Dit zal gebeuren in overleg met de IVD.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

[X] No, continue with question D.
[] Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

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

[] No
[] Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging: kip is het doeldier, vervanging is niet mogelijk omdat er geen in-vitro systeem bestaat om bescherming aan te tonen. Vermindering: Er wordt uitgegaan van de Europese farmacopee infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2), waarin staat aangegeven dat er minimaal 20 dieren voor een vaccinatie/challenge experiment gebruikt moeten worden. Om te voorkomen dat het experiment ongeldig wordt door een te hoge embryonale sterfte en uitval na uitkomst wordt begonnen met 30 eieren. Bij uitval van 30% eieren/kuikens (ook een maat voor veiligheid van het vaccin) kan dan nog steeds de effectiviteit op een valide manier worden bepaald. Verfijning: De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

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

De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Er is geen sprake van herhaling van het testen van eenzelfde vaccin kandidaat. De uitvoering van de proef is als vermeldt in [redacted] echter nu wordt [redacted] kandidaat getest per experiment met [redacted] verschillende challenge tijdstippen. Er worden maximaal [redacted] getest.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

[X] No
[] Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

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

[] No > Continue with question H.
[X] Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

[] No > Continue with question I.
[X] Yes > Will anaesthesia, analgesiaor other pain relieving methods be used?

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Embryonale sterfte, dit betekent het niet uitkomen van de eieren. IBV kliniek; Lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeiing, waterige ogen en benauwdheid

Explain why these effects may emerge.

Embryonale sterfte: mogelijk door in-ovo vaccinatie (door vaccin-virus of schade door injectienaald) of aspecifieke sterfte (geen duidelijke oorzaak)
IBV kliniek: Challenge met IBV virus

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

Door het toepassen van de humane eindpunten

J. Humane endpoints

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

[] No > Continue with question K.
[X] Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

In-ovo vaccinatie is niet pijnlijk, de gezondheid van de kuikens wordt dagelijks en vanaf challenge tot aan het einde van de proef 2x daags geobserveerd mbv een score lijst waarin in IBV ziekteverschijnselen (lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeiing, waterige ogen en benauwdheid) staan vermeldt. Elk verschijnsel wordt beoordeeld met een geen (0), milde (1) of ernstige score (2). Het humane eindpunt wordt bereikt bij ernstige benauwdheid (score 2 ademhaling) OF bij een totale score van ≥ 7 bij een tijdsduur van meer dan 2 opeenvolgende dagen. Ervaring vorige dierproeven: [redacted] kliniek in de controle groep, [redacted] gescoord voor maximaal [redacted] dag in [redacted] dieren, in de overige [redacted] dieren geen kliniek gezien. In [redacted] vaccingroep [redacted], in de [redacted] dood [redacted] er[redacted] die[redacted] dag [redacted]. Dus bovenstaande criteria zijn opgesteld voor een zeer hevige challenge, dit is niet onze ervaring in voorgaande proeven. De ciliostasis test resulteerde in [redacted] in de controle groep, in tegenstelling tot de cilia van de gevaccineerde dieren [redacted]. Dus ondanks de [redacted] is er door deze test [redacted] tussen de beschermde en onbeschermde dieren.

Indicate the likely incidence.

Met inzicht uit vorige proeven: In de vaccin-groepen is de kans 0-20% en in de controle groep 0-50%

K. Classification of severity of procedures

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

De in-ovo vaccinatie: geen ongerief Bloedafname: licht ongerief Challenge: matig ongerief (bij toepassen humane eindpunten) Resulterend in een overall ongerief van matig

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

[] No > Continue with Section 3: 'Signatures'.
[X] Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Ciliostase test is een essentieel onderdeel van de proef

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

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

[X] Yes

7.

WAGENINGEN UR
For quality of life

Postbus 65 | 8200 AB Lelystad

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Wageningen
University & Research

DATUM
13 maart 2017

ONDERWERP
aanvraag projectvergunning
AVD401002017838

ONS KENMERK
AVD401002017838

POSTADRES
[redacted]

BEZOEKADRES
[redacted]

INTERNET
www.wur.nl

KvK NUMMER
09098104

CONTACTPERSOON
[redacted]

TELEFOON
[redacted]

E-MAIL
DEC@wur.nl

Geachte CCD,

Onderstaand het advies dat de DEC-WUR heeft gegeven aangaande het project "In ovo vaccinatie infectieuze bronchitis virus in kippen"

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD401002017838**
2. Titel van het project: In ovo vaccinatie infectieuze bronchitis virus in kippen
3. Titel van de NTS: In ovo vaccinatie infectieuze bronchitis virus in kippen
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag
5. Contactgegevens DEC:
   DEC-WUR
   [redacted]
   Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
   Ontvangen door DEC: 08-02-2017
   Aanvraag compleet: 08-02-2017
   In vergadering besproken: 20-02-2017
   Termijnonderbreking van 22-02-2017 tot 02-03-2017
   Aanpassing aanvraag: 02-03-2017
   Advies aan CCD: zie datum brief
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
9. Correspondentie met de aanvrager
   Datum vragen: 22-02-2017
   Gestelde vragen *en antwoorden*:
   - De HEP's moeten concreter beschreven worden waarbij ook de tijdsduur vermeld wordt. De DEC is van mening dat de HEP's laat gesteld zijn en wil ze zodanig gehanteerd worden dat de MvO van de dieren "matig" niet overschrijdt.
     In-ovo vaccinatie is niet pijnlijk, de gezondheid van de kuikens wordt dagelijks en vanaf challenge tot aan het einde van de proef 2x daags geobserveerd mbv een score lijst waarin in IBV ziekteverschijnselen (lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeiing, waterige ogen en ademhaling) staan vermeldt. Elk verschijnsel wordt beoordeeld met een geen (0), milde (1) of ernstige score (2). Het humane eindpunt wordt bereikt bij ernstige benauwdheid (score 2 ademhaling) OF bij een totale

Wageningen University & Research is specialised in the domain of healthy food and living environment.

score van ≥ 7 bij een tijdsduur van meer dan 2 opeenvolgende dagen.

- De DEC vraagt zich af of de sterfte in het ei als gevolg van verkeerd aanprikken (wat volgens de onderzoeker voelbaar is) verminderd kan worden door de foeten nogmaals aan te prikken.
  Het aanprikken gebeurt met een speciale naald en er wordt van bovenaf geprikt (door luchtkamer en alantois holte). Het doel is om het embryo te injecteren, het raken van het embryo wordt gevoeld tijdens het injecteren maar het is niet te voelen of het embryo verkeerd geraakt wordt. Ervaring uit vorige proef: ongeveer [redacted] van de embryo's zijn geïnjecteerd (+) en [redacted] niet (-), hiervan is het vaccin in de amnion holte beland. Uitkomstpercentages (+) eieren [redacted] en (-) eieren [redacted] Het nogmaals proberen aan te prikken is niet mogelijk omdat juist het voelen ook injecteren betekent en dan zou het embryo een tweede dosis ontvangen. Overigens waren vrijwel alle gevaccineerde dieren (+ en - [redacted]
- Ook wil de DEC weten of het mogelijk is om merkbaar verkeerd aangeprikte eieren direct uit het experiment te nemen en te koelen zodat de foeten niet uitkomen.
  Zoals hierboven vermeldt is het niet te voelen of het embryo verkeerd geraakt wordt. Dus het uitnemen van verkeerd aangeprikte eieren is niet mogelijk.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud)

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

Belangen en waarden

4. Het directe doel is het bepalen van de minimale werkzame dosis van een vaccin waarbij voor langere tijd een goede bescherming optreedt tegen IB.
   Het uiteindelijke doel is het verkrijgen van een optimaal werkend in-ovo vaccin ter bestrijding van IB bij kuikens met minder ongerief van de vaccinatie voor de dieren.
   De DEC heeft vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen en dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belanghebbenden en hun morele waarden in het project zijn:
   - Proefdieren: aantasting van welzijn en integriteit, met name voor de dieren die gechallenged worden wanneer het vaccin niet werkzaam blijkt te zijn en voor de ongevaccineerde controledieren.
   - Doeldieren: minder ongerief door vaccinatie
   - Pluimveehouder: economisch belang, arbeidsvreugde omdat vaccinatie niet meer in de stal hoeft te gebeuren
   - Onderzoeker/CRO: economisch belang
   - Farmaceutische industrie: economische belang
6. Voor zover de DEC dat kan inschatten is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. Opgemerkt wordt dat men met genetisch gemodificeerde vaccinkandidaten werkt.

Proefopzet en haalbaarheid

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

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "licht" voor wat betreft de gevaccineerde dieren. De ongevaccineerde dieren zullen maximaal "matig" ongerief ondervinden. Het ongerief is in de ogen van de DEC realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit: bloedafname, toediening challenge via oogdruppeling en ziekteverschijnselen van IBV-infectie.
12. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier anders dan als gevolg van de proefbehandelingen. De DEC heeft gediscussieerd of de sterfte van de foeten in-ovo als aantasting van de integriteit gezien kan worden. Zij komt tot de conclusie dat de foeten in het ei niet als proefdier gezien worden in de zin der wet.
13. De DEC heeft vastgesteld dat, na aanpassing n.a.v. vragen van de DEC hierover, de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en dat goed in ingeschat welk percentage van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken.

3 V's

14. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Challenge is alleen mogelijk in het doeldier.
15. De DEC heeft vastgesteld dat dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. De onderzoeker heeft een substantieel % reservedieren aangevraagd. De DEC is van mening dat goed is onderbouwd is waarom dit noodzakelijk is (eisen van de Europese Pharmacopee en ervaringen uit eerder onderzoek). De DEC is van mening dat er geen mogelijkheden zijn om tot een vermindering van het aantal dieren te komen.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De onderzoeker heeft in de ogen van de DEC maximaal invulling gegeven aan verfijning door o.a. dieren 2x per dag te observeren een gevoelige test te gebruiken waardoor volstaan kan worden met een milde challenge-infectie. De DEC ziet geen mogelijkheden voor verdere verfijning.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De dieren worden van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven.
19. De dieren worden wel/niet gedood in het kader van het project. Post mortem wordt een ciliostase test uitgevoerd. Deze test is een essentieel onderdeel van het onderzoek. De dieren worden gedood volgens een passende methode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

NTS

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

D. Ethische afweging

De centrale morele vraag van het project is: rechtvaardigt het onderzoek dat ertoe moet leiden dat een vaccin ontwikkeld wordt het ongerief van een beperkt aantal proefdieren. Het gaat hierbij om een vaccin dat minder ongerief geeft bij toediening en beter en langduriger werkt dan de huidige vaccins en dat daardoor grote aantallen soortgenoten gevrijwaard blijven van IB en de gevolgen ervan. In de afweging heeft de DEC geconstateerd dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft meegewogen dat het onderzoek bijdraagt aan de ontwikkeling van een vaccin dat qua werkzaamheid en effectiviteit in potentie beter is dan bestaande vaccins. Als het project zijn doel bereikt dan heeft dit een substantiële bijdrage voor de waarden van gezondheid en welzijn van de dieren. Ook het economische belang voor de veehouder/sector is in die situatie substantieel. Daarnaast speelt voor de pluimveehouder mee dat de vaccinatie niet meer in de stal hoeft te gebeuren. De Onderzoeker/CRO en de farmaceutische industrie hebben beide een economische belang. De DEC heeft dit meegewogen als een beperkt belang. Tot slot zijn de waarden van de proefdieren in het geding. Het gaat hier om een maximaal matige aantasting van welzijn, met name voor de dieren die gechallenged worden wanneer het vaccin niet werkzaam blijkt te zijn en voor de ongevaccineerde controledieren. De integriteit wordt in dit project niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef.

1. Op basis hiervan is de DEC van mening dat in het ongerief voor deze proefdieren te verdedigen is en dat er in dit stadium geen mogelijkheden zijn op het terrein van vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag. De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.

E. Advies

1. Advies aan de CCD:
   - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
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.

Met vriendelijke groet,

[redacted]

secretaris DEC WUR

8.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research
[redacted]
Postbus 59
6700 AB WAGENINGEN

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002017838
Bijlagen
2

Datum 21 februari 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 20 februari 2017. Het gaat om uw project "In ovo vaccinatie infectieuze bronchitis virus in kippen". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD401002017838. 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).

Datum:
21 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD401002017838

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
21 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD401002017838

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	40100
Naam instelling of organisatie:	Stichting Wageningen Research
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
KvK-nummer:	908104
Postbus:	59
Postcode en plaats:	6700 AB WAGENINGEN
IBAN:	NL10RABO0397066465
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	Wageningen UR

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
21 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD401002017838

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam:	[redacted]
Afdeling:	[redacted]
Telefoonnummer:	[redacted]
E-mailadres:	[redacted]

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum:	1 mei 2017
Geplande einddatum:	29 april 2022
Titel project:	In ovo vaccinatie infectieuze bronchitis virus in kippen
Titel niet-technische samenvatting:	In ovo vaccinatie infectieuze bronchitis virus in kippen
Naam DEC:	DEC-WUR
Postadres DEC:	Droevendaalsesteeg 4 6708 PB Wageningen
E-mailadres DEC:	dec@wur.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen:	€ 1.441,-
De leges voldoet u:	na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:	[x] Projectvoorstel [x] Beschrijving Dierproeven [x] Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen:	[x] DEC-advies

Ondertekening

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Plaats:	Wageningen
Datum:	20 februari 2017

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002017838
Bijlagen
2

Datum 21 februari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 21 februari 2017
Vervaldatum: 23 maart 2017
Factuurnummer: 170838
Ordernummer: WUR1037550

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD401002017838	€ 1.441,00

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.

9.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research
[redacted]
Postbus 59
6700 AB WAGENINGEN

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002017838

Datum 23 maart 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 20 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "In ovo vaccinatie infectieuze bronchitis virus in kippen" met aanvraagnummer AVD401002017838. 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:

Onduidelijkheden
In de drie bijlagen geeft u aan dat pijnbestrijding niet wordt toegepast terwijl dit wel wenselijk is. Kunt u onderbouwen waarom pijnbestrijding niet wordt toegepast?

In de drie bijlagen geeft u aan dat de dieren gehuisvest worden buiten een instelling van een vergunninghouder, maar u heeft de huisvesting niet verder beschreven of onderbouwd waarom deze dierproef buiten een instelling van een vergunninghouder wordt uitgevoerd en hoe u verzekert dat huisvesting en verzorging van de dieren adequaat gebeurt.
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.

Wanneer een beslissing
De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben 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

Datum:
23 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD401002017838

Centrale Commissie Dierproeven

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: Stichting Wageningen Research

Adres: .....

Postcode en plaats: .....

Aanvraagnummer: AVD401002017838

2 Bijlagen
Welke bijlagen stuurt u mee?
Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

O Projectvoorstel

O Beschrijving Dierproeven

O Niet-technische samenvatting

O Melding Machtiging

O Aanvraagformulier

O .....

O .....

O .....

Datum:
23 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD401002017838

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

10.

[redacted]

Aan: CCD
Onderwerp: AVD401002017838

CCD,

Hierbij de antwoorden in reactie op uw verzoek om aanvullende info (brief d.d. 23 maart) met betrekking tot project AVD4010020176838:

* Pijnbestrijding (H): stond wel in iVention, maar is in de opgestuurde versie weggevallen (blijkt fout van iVention systeem). In de nieuwe versie Description Animal Procedure (7) staat het antwoord weergegeven: "Omdat dit mogelijk de uitkomst van de proef beïnvloedt. De pijn zal ontstaan na de IBV challenge, bij het bereiken van het humane eindpunt worden de dieren direct geëuthanaseerd."

* Huisvesting (G): Antwoord verkeerd ingevuld, yes moet no zijn, is aangepast en weergegeven in de nieuwe versie 'Description Animal Procedure (7)'

De nieuwe versie Description Animal Procedure (7) is separaat per NetFTP opgestuurd

Met vriendelijke groet,
namens mevrouw Jelsma

[redacted]
Wageningen University & Research
[redacted]
www.wur.nl
[redacted]

11.

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure testen van de minimale dosering vaccin kandidaat voor bescherming in SPF kippen.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

De 19-daagse bebroede eieren worden *in-ovo* gevaccineerd met 2 verschillende doseringen van [redacted] IBV vaccin[redacted] tezamen met een placebo vaccinatie (1 controlegroep).
In totaal worden er op deze manier [redacted] kandidaat vaccins getest (1 kandidaat vaccin per experiment).
De *in-ovo* vaccinatie wordt uitgevoerd in een [redacted] dierruimte per groep en in dezelfde ruimte worden de eieren uitgebroed. Zodra de eieren uitkomen wordt het uitkomst percentage bepaald en de gezondheid van de kuikens wordt geïnspecteerd en worden ze in beide vleugels gemerkt met een uniek nummer per dier. De kuikens worden vervolgens gedurende 21 dagen dagelijks verzorgd en geobserveerd. Op de leeftijd van 21 dagen wordt een serum-bloedmonster afgenomen om de immuunstatus van het dier te bepalen. Tevens worden de dieren geïnfecteerd (challenge) met IBV virus via oogdruppeling. Na de challenge worden de dieren gedurende 5 dagen 2x per dag klinisch geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de kippen geëuthanaseerd en worden tijdens de sectie de trachea's (luchtpijp) microscopisch onderzocht (ciliostase test) zoals voorgeschreven in de Europese farmacopee (pg. 721). De aan- of afwezigheid van bewegende cilia (trilharen) in de trachea geven de mate van bescherming aan. Zijn de cilia intact dan is een gevaccineerd dier beschermd tegen het challenge virus. Bij de controle dieren die niet gevaccineerd zijn cilia niet meer intact. Via een score-systeem wordt de mate van bescherming vastgesteld.

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

De in-ovo vaccinatie wordt 1 maal toegepast, het vaccin wordt in het 19-daags bebroede ei gespoten bij voorkeur in het embryo (in minstens 50% van de eieren per groep). Indien de injectienaald het embryo niet kan bereiken (dat is te voelen) heeft dit tot gevolg dat het vaccin in de amnion holte zal terechtkomen. In voorgaande proeven leek er [redacted] waarin er [redacted] voorkwam bij de [redacted] eieren. [redacted] van de eieren als [redacted]
Na de uitkomst worden de dieren dagelijks verzorgd en geobserveerd. Als de kuikens 21 dagen oud zijn wordt er een bloedmonster genomen om de antilichaamsrespons gericht tegen het vaccin-virus vast te stellen. Door randomisatie worden 20 dieren per groep geselecteerd voor de challenge met IBV virus, deze challenge wordt gedaan via oogdruppeling. De dieren worden vervolgens gedurende vijf dagen 2x daags verzorgd en klinische geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de dieren geëuthanaseerd.

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

In de Europese farmacopee Avian infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2) staat beschreven dat per vaccingroep niet minder dan 20 dieren moeten worden gebruikt voor het vaccinatie/challenge experiment.
Echter omdat hier begonnen wordt met bebroede eieren, is ervoor gekozen om met 30 eieren per groep te starten. Hiermee wordt ondervangen dat voor de uiteindelijke effectiviteitsstudie (challenge) te weinig kuikens beschikbaar zijn, waardoor het experiment ongeldig zou zijn. In ovo vaccinatie wordt veelvuldig toegepast en geeft weinig embryo verliezen. In een kleinschalig experiment moet er echter altijd rekening mee gehouden worden dat door toeval in een groep meer embryonale sterfte optreedt dan gemiddeld. Embryonale sterfte kan optreden als gevolg van toeval (niet gerelateerd aan de in ovo vaccinatie), maar ook door de in ovo vaccinatie (door het mechanische proces of als gevolg van het IBV vaccin).
De bebroede eieren worden dagelijks geschouwd, dit betekent dat mbv een lamp wordt gekeken of het embryo nog leeft.

Ervaring uit eerdere proeven:
[redacted] vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van [redacted] tot slechts [redacted]
[redacted] twee vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van [redacted]
[redacted] keer controle groep [redacted]: uitkomstpercentages [redacted]
Uitval tijdens opgroei-periode tot leeftijd 21 dagen varieerde van minimaal 2 tot maximaal 5 dieren per groep.
Euthanasie door randomisatie op dag van challenge:
Totaal zijn er in de geteste [redacted] groepen, [redacted] dieren geëuthanaseerd op 21 dagen leeftijd.
In geval van de groep met uitkomst van [redacted] en uitval van [redacted] dieren betekende het dat slechts [redacted] voor de challenge geëuthanaseerd moest worden.
Bovenstaande geeft aan dat een start met 30 eieren een realistische inschatting geeft om het beoogde aantal van 20 dieren voor challenge te behalen.

B. The animals

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

Er worden kuikens (leghennen of broilers) gebruikt die uit SPF eieren zijn uitgebroed.
Er worden maximaal 90 stuks bebroede eieren per experiment gebruikt. Het experiment bestaat uit [redacted] in twee groepen wordt het vaccin toegediend in twee verschillende doseringen en de derde groep betreft de ongevaccineerde [redacted] controle groep. In totaal zullen er op deze manier [redacted] vaccinkandidaten getest worden en dat betekent dus dat er in totaal [redacted] bebroede eieren gebruikt zullen worden. Indien alle eieren per experiment (=1 vaccin kandidaat) uitkomen is er sprake van 90 kippen (totaal van 3x30 eieren per groep). De challenge met het IBV virus op de leeftijd van 21 dagen wordt uitgevoerd op 20 dieren per groep. De overige dieren (surplus) worden door randomisatie uit de proef gehaald en geëuthanaseerd. De dieren die gechallenged zijn zullen op een leeftijd van 26 dagen of eerder (indien ernstige kliniek) worden geëuthanaseerd.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

[X] No, continue with question D.
[] Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

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

[] No
[] Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging: kip is het doeldier, vervanging is niet mogelijk omdat er geen in-vitro systeem bestaat om bescherming aan te tonen. Vermindering: Er wordt uitgegaan van de Europese farmacopee infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2), waarin staat aangegeven dat er minimaal 20 dieren voor een vaccinatie/challenge experiment gebruikt moeten worden. Om te voorkomen dat het experiment ongeldig wordt door een te hoge embryonale sterfte en uitval na uitkomst wordt begonnen met 30 eieren. Bij uitval van 30% eieren/kuikens (ook een maat voor veiligheid van het vaccin) kan dan nog steeds de effectiviteit op een valide manier worden bepaald. Verfijning: De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

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

De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Er is geen sprake van herhaling van het testen van eenzelfde vaccin kandidaat. De uitvoering van de proef is als vermeldt in [redacted] echter nu wordt [redacted] kandidaat getest per experiment met [redacted] verschillende doseringen. Er worden maximaal [redacted] getest.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

[X] No
[] Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

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

[X] No > Continue with question H.
[] Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

[] No > Continue with question I.
[X] Yes > Will anaesthesia, analgesiaor other pain relieving methods be used?

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

Omdat dit mogelijk de uitkomst van de proef beïnvloedt. De pijn zal ontstaan na de IBV challenge, bij het bereiken van het humane eindpunt worden de dieren direct geëuthanaseerd.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Embryonale sterfte, dit betekent het niet uitkomen van de eieren. IBV kliniek; Lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeiing, waterige ogen en benauwdheid

Explain why these effects may emerge.

Embryonale sterfte: mogelijk door in-ovo vaccinatie (door vaccin-virus of schade door injectienaald) of aspecifieke sterfte (geen duidelijke oorzaak)
IBV kliniek: Challenge met IBV virus

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

Door het toepassen van de humane eindpunten

J. Humane endpoints

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

[] No > Continue with question K.
[X] Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

In-ovo vaccinatie is niet pijnlijk, de gezondheid van de kuikens wordt dagelijks en vanaf challenge tot aan het einde van de proef 2x daags geobserveerd mbv een score lijst waarin in IBV ziekteverschijnselen (lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeiing, waterige ogen en ademhaling) staan vermeldt. Elk verschijnsel wordt beoordeeld met een geen (0), milde (1) of ernstige score (2). Het humane eindpunt wordt bereikt bij ernstige benauwdheid (score 2 ademhaling) OF bij een totale score van ≥ 7 bij een tijdsduur van meer dan 2 opeenvolgende dagen. Ervaring vorige dierproeven: [redacted] in de controle groep, [redacted] gescoord voor maximaal [redacted] dag in [redacted] dieren, in de overige [redacted] dieren geen klinlek gezien. In [redacted] vaccingroep [redacted], in de [redacted] dood [redacted] en [redacted] dier [redacted] dag [redacted]. Dus bovenstaande criteria zijn opgesteld voor een zeer hevige challenge, dit is niet onze ervaring in voorgaande proeven. De ciliostasis test resulteerde in [redacted] in de controle groep, in tegenstelling tot de cilia van de gevaccineerde dieren [redacted]. Dus ondanks de [redacted] is er door deze test [redacted] tussen de beschermde en onbeschermde dieren.

Indicate the likely incidence.

Met inzicht uit vorige proeven: In de vaccin-groepen is de kans 0-20% en in de controle groep 0-50%

K. Classification of severity of procedures

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

De in-ovo vaccinatie: geen ongerief Bloedafname: licht ongerief Challenge: matig ongerief (bij toepassen humane eindpunten) Resulterend in een overall ongerief van matig

End of experiment

L. Method of killing

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

[] No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Ciliostase test is een essentieel onderdeel van de proef

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

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

[X] Yes

12.

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure testen van de werkzaamheid in dieren met maternale immuniteit ook volgens de EP monograaf.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In deze studie wordt de werkzaamheid getest in dieren met maternale immuniteit. Hiertoe worden 19-daagse bebroede eieren in-ovo gevaccineerd met meest geschikte vaccin-kandidaten uit studie 1 (maximaal 3) tezamen met een placebo vaccinatie (1 controlegroep).

De experimentele opzet is hetzelfde als studie 1.De *in-ovo* vaccinatie wordt uitgevoerd in een [redacted] dierruimte per groep en in dezelfde ruimte worden de eieren uitgebroed. Zodra de eieren uitkomen wordt het uitkomst percentage bepaald en de gezondheid van de kuikens wordt geïnspecteerd en worden ze in beide vleugels gemerkt met een uniek nummer per dier. De kuikens worden vervolgens gedurende 21 dagen dagelijks verzorgd en geobserveerd. Op de leeftijd van 21 dagen wordt een serum-bloedmonster afgenomen om de immuunstatus van het dier te bepalen. Tevens worden de dieren geïnfecteerd (challenge) met IBV virus via oogdruppeling. Na de challenge worden de dieren gedurende 5 dagen 2x per dag klinisch geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de kippen geëuthanaseerd en worden tijdens de sectie de trachea's (luchtpijp) microscopisch onderzocht (ciliostase test) zoals voorgeschreven in de Europese farmacopee (pg. 721). De aan- of afwezigheid van bewegende cilia (trilharen) in de trachea geven de mate van bescherming aan. Zijn de cilia intact dan is een gevaccineerd dier beschermd tegen het challenge virus. Bij de controle dieren die niet gevaccineerd zijn cilia niet meer intact. Via een score-systeem wordt de mate van bescherming vastgesteld.

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

De in-ovo vaccinatie wordt 1 maal toegepast, het vaccin wordt in het 19-daags bebroede ei gespoten bij voorkeur in het embryo (in minstens [redacted] Indien de injectienaald het embryo niet kan bereiken (dat is te voelen) is de consequentie dat het vaccin in de amnion holte zal worden gespoten. In voorgaande proeven leek er een [redacted] waarin er [redacted] voorkwam bij de [redacted] eieren. [redacted] van de eieren als [redacted]
Na de uitkomst worden de dieren dagelijks verzorgd en geobserveerd. Als de kuikens 21 dagen oud zijn wordt er een bloedmonster genomen om de antilichaamsrespons gericht tegen het vaccin-virus vast te stellen. Door randomisatie worden 20 dieren per groep geselecteerd voor de challenge met IBV virus, deze challenge wordt gedaan via oogdruppeling. De dieren worden vervolgens gedurende vijf dagen 2x daags verzorgd en klinische geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de dieren geëuthanaseerd.

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

In de Europese farmacopee Avian infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2) staat beschreven dat per vaccingroep niet minder dan 20 dieren moeten worden gebruikt voor het vaccinatie/challenge experiment.
Echter omdat hier begonnen wordt met bebroede eieren, is ervoor gekozen om met 30 eieren per groep te starten. Hiermee wordt ondervangen dat voor de uiteindelijke effectiviteitsstudie (challenge) te weinig kuikens beschikbaar zijn, waardoor het experiment ongeldig zou zijn. In ovo vaccinatie wordt veelvuldig toegepast en geeft weinig embryo verliezen. In een kleinschalig experiment moet er echter altijd rekening mee gehouden worden dat door toeval in een groep meer embryonale sterfte optreedt dan gemiddeld. Embryonale sterfte kan optreden als gevolg van toeval (niet gerelateerd aan de in ovo vaccinatie), maar ook door de in ovo vaccinatie (door het mechanische proces of als gevolg van het IBV vaccin).
De bebroede eieren worden dagelijks geschouwd, dit betekent dat mbv een lamp wordt gekeken of het embryo nog leeft.

Ervaring uit eerdere proeven:
[redacted] vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van [redacted] tot slechts [redacted]
[redacted] twee vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van [redacted]
[redacted] keer controle groep [redacted]: uitkomstpercentages [redacted]
Uitval tijdens opgroei-periode tot leeftijd 21 dagen varieerde van minimaal 2 tot maximaal 5 dieren per groep.
Euthanasie door randomisatie op dag van challenge:
Totaal zijn er in de geteste 6 groepen, [redacted] dieren geëuthanaseerd op 21 dagen leeftijd.
In geval van de groep met uitkomst van [redacted] en uitval van [redacted] betekende het dat [redacted] voor de challenge geëuthanaseerd moest worden.
Bovenstaande geeft aan dat een start met 30 eieren een realistische inschatting geeft om het beoogde aantal van 20 dieren voor challenge te behalen.

B. The animals

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

Er worden kuikens (leghennen of broilers) gebruikt die uit commerciële eieren zijn uitgebroed. De moeder-flock wordt getest op aanwezigheid van antilichamen tegen infectieuze bronchitis (dit is een selectiecriterium voor het gebruik van de eieren voor de proef). Er worden maximaal [redacted] stuks bebroede eieren gebruikt, dit betekent in totaal [redacted] en [redacted].
De controle groep bestaat uit [redacted] eieren omdat er [redacted] eieren gereserveerd worden voor het bepalen van de immuunstatus van deze dieren (maternale antilichamen tegen IBV). Na uitkomst zullen er [redacted] kuikens na het nemen van de bloedmonsters niet deelnemen aan de proef en worden geëuthanaseerd. Er worden dus [redacted] eieren uitgebroed alleen voor bloedafname. De dierproef gaat verder met [redacted] eieren/kuikens per groep.

De challenge met het IBV virus op de leeftijd van 21 dagen wordt uitgevoerd op 20 dieren per groep. De overige dieren (surplus*) worden gerandomiseerd uit de proef gehaald en geëuthanaseerd.
De dieren die gechallenged zijn zullen op een leeftijd van 26 dagen of eerder (indien ernstige kliniek) worden geëuthanaseerd. Tijdens sectie wordt de bescherming tegen de challenge getest op trachea's adhv de cilliostase test.
* Surplus dieren: Er zal een evaluatie plaatsvinden na het eerste experiment (bijlage 1) om te bepalen of het aantal surplus dieren (max [redacted] per groep) naar beneden bijgesteld kan worden. Dit zal gebeuren in overleg met de IVD.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

[X] No, continue with question D.
[] Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

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

[] No
[] Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging: kip is het doeldier, vervanging is niet mogelijk omdat er geen in-vitro systeem bestaat om bescherming aan te tonen. Vermindering: Er wordt uitgegaan van de Europese farmacopee infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2), waarin staat aangegeven dat er minimaal 20 dieren voor een vaccinatie/challenge experiment gebruikt moeten worden. Om te voorkomen dat het experiment ongeldig wordt door een te hoge embryonale sterfte en uitval na uitkomst wordt begonnen met 30 eieren. Bij uitval van 30% eieren/kuikens (ook een maat voor veiligheid van het vaccin) kan dan nog steeds de effectiviteit op een valide manier worden bepaald. Verfijning: De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

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

De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te

pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Er is geen sprake van herhaling van het testen van eenzelfde vaccin kandidaat. De uitvoering van de proef is als vermeldt in [redacted] echter nu worden er maximaal [redacted] kandidaten getest en zijn de kuikens afkomstig uit conventionele bebroede eieren.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

[X] No
[] Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

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

[X] No > Continue with question H.
[] Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

[] No > Continue with question I.
[X] Yes > Will anaesthesia, analgesiaor other pain relieving methods be used?

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

Omdat dit mogelijk de uitkomst van de proef beïnvloedt. De pijn zal ontstaan na de IBV challenge, bij het bereiken van het humane eindpunt worden de dieren direct geëuthanaseerd.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Embryonale sterfte, dit betekent het niet uitkomen van de eieren. IBV kliniek; Lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeiing, waterige ogen en benauwdheid

Explain why these effects may emerge.

Embryonale sterfte: mogelijk door in-ovo vaccinatie (door vaccin-virus of schade door injectienaald) of aspecifieke sterfte (geen duidelijke oorzaak)
IBV kliniek: Challenge met IBV virus

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

Door het toepassen van de humane eindpunten

J. Humane endpoints

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

[] No > Continue with question K.
[X] Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

In-ovo vaccinatie is niet pijnlijk, de gezondheid van de kuikens wordt dagelijks en vanaf challenge tot aan het einde van de proef 2x daags geobserveerd mbv een score lijst waarin in IBV ziekteverschijnselen (lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeiing, waterige ogen en benauwdheid) staan vermeldt. Elk verschijnsel wordt beoordeeld met een geen (0), milde (1) of ernstige score (2). Het humane eindpunt wordt bereikt bij ernstige benauwdheid (score 2 ademhaling) OF bij een totale score van ≥ 7 bij een tijdsduur van meer dan 2 opeenvolgende dagen. Ervaring vorige dierproeven: [redacted] kliniek in de controle groep, [redacted] gescoord voor maximaal [redacted] dag in [redacted] dieren, in de overige [redacted] dieren geen kliniek gezien. In [redacted] vaccingroep [redacted], in de [redacted] dood [redacted] en [redacted] dier[redacted] dag [redacted]. Dus bovenstaande criteria zijn opgesteld voor een zeer hevige challenge, dit is niet onze ervaring in voorgaande proeven. De ciliostasis test resulteerde in [redacted] in de controle groep, in tegenstelling tot de cilia van de gevaccineerde dieren [redacted] Dus ondanks de [redacted] is er door deze test [redacted] tussen de beschermde en onbeschermde dieren.

Indicate the likely incidence.

Met inzicht uit vorige proeven: In de vaccin-groepen is de kans 0-20% en in de controle groep 0-50%

K. Classification of severity of procedures

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

De in-ovo vaccinatie: geen ongerief Bloedafname: licht ongerief Challenge: matig ongerief (bij toepassen humane eindpunten) Resulterend in een overall ongerief van matig

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

[] No > Continue with Section 3: 'Signatures'.
[X] Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Ciliostase test is een essentieel onderdeel van de proef

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

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

[X] Yes

13.

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 3	Type of animal procedure testen van de duur van de bescherming, met een challenge op 6 weken na vaccinatie en een challenge 8 weken na vaccinatie.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In dit experiment wordt de duur van bescherming/immuniteit onderzocht aan de hand van een challenge op 6 weken leeftijd en op 8 weken leeftijd, dit in tegenstelling tot de eerdere experimenten waarbij de challenge op een leeftijd van 3 weken uitgevoerd werd.
De verdere proefopzet is verder gelijk aan studie 1.
Er worden 19-daagse bebroede eieren in-ovo gevaccineerd met de meest geschikte vaccin-kandidaten uit studie 1 en 2 tezamen [redacted] met een placebo vaccinatie (1 controlegroep).
De *in-ovo* vaccinatie wordt uitgevoerd in een [redacted] dierruimte per groep en in dezelfde ruimte worden de eieren uitgebroed. Zodra de eieren uitkomen wordt het uitkomst percentage bepaald en de gezondheid van de kuikens wordt geïnspecteerd en worden ze in beide vleugels gemerkt met een uniek nummer per dier. De kuikens worden vervolgens gedurende 21 dagen dagelijks verzorgd en geobserveerd. Op de leeftijd van 21 dagen wordt een serum-bloedmonster afgenomen om de immuunstatus van het dier te bepalen. Tevens worden de dieren geïnfecteerd (challenge) met IBV virus via oogdruppeling. Na de challenge worden de dieren gedurende 5 dagen 2x per dag klinisch geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de kippen geëuthanaseerd en worden tijdens de sectie de trachea's (luchtpijp) microscopisch onderzocht (ciliostase test) zoals voorgeschreven in de Europese farmacopee (pg. 721). De aan- of afwezigheid van bewegende cilia (trilharen) in de trachea geven de mate van bescherming aan. Zijn de cilia intact dan is een gevaccineerd dier beschermd tegen het challenge virus. Bij de controle dieren die niet gevaccineerd zijn cilia niet meer intact. Via een score-systeem wordt de mate van bescherming vastgesteld.

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

De in-ovo vaccinatie wordt 1 maal toegepast, het vaccin wordt in het 19-daags bebroede ei gespoten bij voorkeur in het embryo (in minstens 50%). Indien de injectienaald het embryo niet kan bereiken (dat is te voelen) is de consequentie dat het vaccin in de amnion holte zal worden gespoten. In voorgaande proeven leek er [redacted] waarin er [redacted] voorkwam bij de [redacted] eieren. [redacted] van de eieren als [redacted]
Na de uitkomst worden de dieren dagelijks verzorgd en geobserveerd. Als de kuikens 21 dagen oud zijn wordt er een bloedmonster genomen om de antilichaamsrespons gericht tegen het vaccin-virus vast te stellen. Door randomisatie worden 20 dieren per groep geselecteerd voor de challenge met IBV virus, deze challenge wordt gedaan via oogdruppeling. De dieren worden vervolgens gedurende vijf dagen 2x daags verzorgd en klinische geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de dieren geëuthanaseerd.

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

In de Europese farmacopee Avian infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2) staat beschreven dat per vaccingroep niet minder dan 20 dieren moeten worden gebruikt voor het vaccinatie/challenge experiment.
Echter omdat hier begonnen wordt met bebroede eieren, is ervoor gekozen om met 30 eieren per groep te starten. Hiermee wordt ondervangen dat voor de uiteindelijke effectiviteitsstudie (challenge) te weinig kuikens beschikbaar zijn, waardoor het experiment ongeldig zou zijn. In ovo vaccinatie wordt veelvuldig toegepast en geeft weinig embryo verliezen. In een kleinschalig experiment moet er echter altijd rekening mee gehouden worden dat door toeval in een groep meer embryonale sterfte optreedt dan gemiddeld. Embryonale sterfte kan optreden als gevolg van toeval (niet gerelateerd aan de in ovo vaccinatie), maar ook door de in ovo vaccinatie (door het mechanische proces of als gevolg van het IBV vaccin).
De bebroede eieren worden dagelijks geschouwd, dit betekent dat mbv een lamp wordt gekeken of het embryo nog leeft.

Ervaring uit eerdere proeven:
[redacted] vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van [redacted]
[redacted] twee vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van [redacted]
[redacted] keer controle groep([redacted] uitkomstpercentages beide[redacted]
Uitval tijdens opgroei-periode tot leeftijd 21 dagen varieerde van minimaal 2 tot maximaal 5 dieren per groep.
Euthanasie door randomisatie op dag van challenge:
Totaal zijn er in de geteste [redacted] groepen, [redacted] dieren geëuthanaseerd op 21 dagen leeftijd.
In geval van de groep met uitkomst van [redacted] en uitval van [redacted] dieren betekende het dat [redacted] voor de challenge geëuthanaseerd moest worden.
Bovenstaande geeft aan dat een start met 30 eieren een realistische inschatting geeft om het beoogde aantal van 20 dieren voor challenge te behalen.

B. The animals

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

Er worden kuikens (leghennen of broilers) gebruikt die uit SPF eieren zijn uitgebroed.
Er worden maximaal 90 stuks bebroede eieren per experiment gebruikt. Het experiment bestaat uit 3 groepen eieren (30 per groep), in twee groepen wordt het vaccin toegediend en de derde groep betreft de ongevaccineerde [redacted] controle groep, de challenge vindt plaats op twee verschillende tijdstippen. In totaal zullen er op deze manier [redacted] kandidaten getest worden en dat betekent dus dat er in totaal [redacted] bebroede eieren gebruikt zullen worden.
Indien alle eieren per experiment [redacted] uitkomen is er sprake van 90 kippen (totaal van 3x30 eieren per groep). De challenge met het IBV virus op de leeftijd van 21 dagen wordt uitgevoerd qp 20 dieren per groep. De overige dieren (surplus*) worden door randomisatie uit de proef gehaald en geëuthanaseerd. De dieren die gechallenged zijn zullen op een leeftijd van 26 dagen of eerder (indien ernstige kliniek) worden geëuthanaseerd.

* Surplus dieren: Er zal een evaluatie plaatsvinden na het eerste experiment (bijlage 1) om te bepalen of het aantal surplus dieren (max 10 per groep) naar beneden bijgesteld kan worden. Dit zal gebeuren in overleg met de IVD.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

[X] No, continue with question D.
[] Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

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

[] No
[] Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging: kip is het doeldier, vervanging is niet mogelijk omdat er geen in-vitro systeem bestaat om bescherming aan te tonen. Vermindering: Er wordt uitgegaan van de Europese farmacopee infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2), waarin staat aangegeven dat er minimaal 20 dieren voor een vaccinatie/challenge experiment gebruikt moeten worden. Om te voorkomen dat het experiment ongeldig wordt door een te hoge embryonale sterfte en uitval na uitkomst wordt begonnen met 30 eieren. Bij uitval van 30% eieren/kuikens (ook een maat voor veiligheid van het vaccin) kan dan nog steeds de effectiviteit op een valide manier worden bepaald. Verfijning: De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

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

De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Er is geen sprake van herhaling van het testen van eenzelfde vaccin kandidaat. De uitvoering van de proef is als vermeldt in [redacted] echter nu wordt [redacted] kandidaat getest per experiment met twee verschillende challenge tijdstippen. Er worden maximaal [redacted] kandidaten getest.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

[X] No
[] Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

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

[X] No > Continue with question H.
[] Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

[] No > Continue with question I.
[X] Yes > Will anaesthesia, analgesiaor other pain relieving methods be used?

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

Omdat dit mogelijk de uitkomst van de proef beïnvloedt. De pijn zal ontstaan na de IBV challenge, bij het bereiken van het humane eindpunt worden de dieren direct geëuthanaseerd.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Embryonale sterfte, dit betekent het niet uitkomen van de eieren. IBV kliniek; Lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeiing, waterige ogen en benauwdheid

Explain why these effects may emerge.

Embryonale sterfte: mogelijk door in-ovo vaccinatie (door vaccin-virus of schade door injectienaald) of aspecifieke sterfte (geen duidelijke oorzaak)
IBV kliniek: Challenge met IBV virus

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

Door het toepassen van de humane eindpunten

J. Humane endpoints

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

[] No > Continue with question K.
[X] Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

In-ovo vaccinatie is niet pijnlijk, de gezondheid van de kuikens wordt dagelijks en vanaf challenge tot aan het einde van de proef 2x daags geobserveerd mbv een score lijst waarin in IBV ziekteverschijnselen (lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeiing, waterige ogen en benauwdheid) staan vermeldt. Elk verschijnsel wordt beoordeeld met een geen (0), milde (1) of ernstige score (2). Het humane eindpunt wordt bereikt bij ernstige benauwdheid (score 2 ademhaling) OF bij een totale score van ≥ 7 bij een tijdsduur van meer dan 2 opeenvolgende dagen. Ervaring vorige dierproeven: [redacted] kliniek in de controle groep, [redacted] gescoord voor maximaal [redacted] dag in [redacted] dieren, in de overige [redacted] dieren geen kliniek gezien. In [redacted] vaccingroep [redacted] in de [redacted] dood [redacted] er[redacted] dier [redacted] dag [redacted]. Dus bovenstaande criteria zijn opgesteld voor een zeer hevige challenge, dit is niet onze ervaring in voorgaande proeven. De ciliostasis test resulteerde in [redacted] in de controle groep, in tegenstelling tot de cilia van de gevaccineerde dieren [redacted] Dus ondanks de [redacted] is er door deze test [redacted] tussen de beschermde en onbeschermde dieren.

Indicate the likely incidence.

Met inzicht uit vorige proeven: In de vaccin-groepen is de kans 0-20% en in de controle groep 0-50%

K. Classification of severity of procedures

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

De in-ovo vaccinatie: geen ongerief Bloedafname: licht ongerief Challenge: matig ongerief (bij toepassen humane eindpunten) Resulterend in een overall ongerief van matig

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

[] No > Continue with Section 3: 'Signatures'.
[X] Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Ciliostase test is een essentieel onderdeel van de proef

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

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

[X] Yes

15.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research
[redacted]
Postbus 59
6700 AB WAGENINGEN

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002017838
Bijlagen
1

Datum 10 april 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 20 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "In ovo vaccinatie infectieuze bronchitis virus in kippen" met aanvraagnummer AVD401002017838. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 13 maart 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Er is uitgelegd waarom geen pijnbestrijding wordt toegepast en het antwoord bij vraag G van de verschillende bijlagen is nu correct ingevuld.

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 "In ovo vaccinatie infectieuze bronchitis virus in kippen" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 mei 2017 tot en met 29 april 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure
Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC-WUR. Dit advies is opgesteld op 13 maart 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.

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:

[redacted]

Algemeen Secretaris

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

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:	Stichting Wageningen Research
Adres:	Postbus 59
Postcode en plaats:	6700 AB WAGENINGEN
Deelnemersnummer:	40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 mei 2017 tot en met 29 april 2022, voor het project "In ovo vaccinatie infectieuze bronchitis virus in kippen" met aanvraagnummer AVD401002017838, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-WUR. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 20 februari 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 27 maart 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 maart 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 13 maart 2017, ontvangen op 13 maart 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 13 maart 2017

Aanvraagnummer:
AVD401002017838

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 testen van de minimale dosering vaccin kandidaat voor bescherming in SPF kippen.				360 eieren, hiervan worden 240 kippen geselecteerd voor challenge
	Kippen /	240	100% Matig	
3.4.4.2 testen van de werkzaamheid in dieren met maternale immuniteit ook volgens de EP monograaf.				130 eieren, hiervan worden 90 kippen geselecteerd voor challenge of bloedafname
	Kippen /	90	100% Matig	
3.4.4.3 testen van de duur van de bescherming, met een challenge op 6 weken na vaccinatie en een challenge 8 weken na vaccinatie.				270 eieren, hiervan worden 180 kippen geselecteerd voor challenge
	Kippen /	180	100% Matig	

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.

Aanvraagnummer:
AVD401002017838

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:
AVD401002017838

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

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.