

Inventaris Wob-verzoek W17-11		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	documenten NTS2017896	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x		x		
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Advies CCD		x						x
8	Beschikking en vergunning				x		x		

AVD 401002017 896

Aanvraag  
Projectvergunning Dierproeven  
Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	40100
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	

1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Stichting Wageningen Research
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	9098104

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.	Straat en huisnummer	Akkermaalsbos 12
		Postbus	59 B
		Postcode en plaats	6700AW Wageningen
		Iban	NL10RABO0397066465
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR

1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker	(Titel) naam en voorletters	[REDACTED]
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		Email adres	[REDACTED]

1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) naam en voorletters	[ ] Dhr. [ ] Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		Email adres	
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	
		Email adres	
1.7	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag <input checked="" type="checkbox"/> Nee	

## 2 Over uw aanvraag

2.1	Wat voor aanvraag doet u?	<input type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3	
		<input type="checkbox"/> Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het Dierenwelzijn  Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2	
		<input type="checkbox"/> Wijziging 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?	<input type="checkbox"/> Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier	
		<input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3	

2.3	Is dit een melding voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?	<input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
		<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

### 3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en Startdatum	1-8-2017	
	einddatum van het project?	31-7-2022	
3.2	Wat is de titel van het project?	Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassay.	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassay.	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC Wageningen UR
		Postadres	Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen
		E-mailadres	dec@wur.nl

### 4 Betaalgegevens

4.1	Om welk type aanvraag gaat het?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning €	1035,-
		<input type="checkbox"/> Wijziging €	
4.2	Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD	<input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso	
		<input checked="" type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur	

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.

## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel + 1 appendix

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

Bestelorder WUR1055480

## 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:

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.

Centrale Commissie  
Dierproeven Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

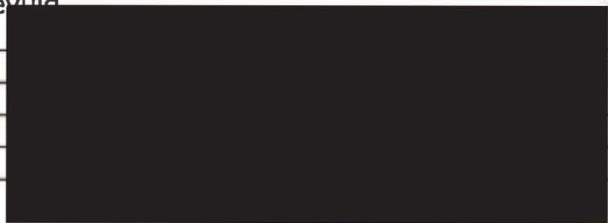
Naam \_\_\_\_\_

Functie \_\_\_\_\_

Plaats \_\_\_\_\_

Datum \_\_\_\_\_

Handtekening \_\_\_\_\_



**Form  
Project proposal**

- This form should be used to write the project proposal 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](http://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.	Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassay.

## 2 Categories

2.1	Please tick each of the following boxes that applies to your project.	<input type="checkbox"/> Basic Research
		<input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research
		<input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production
		<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
		<input type="checkbox"/> 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

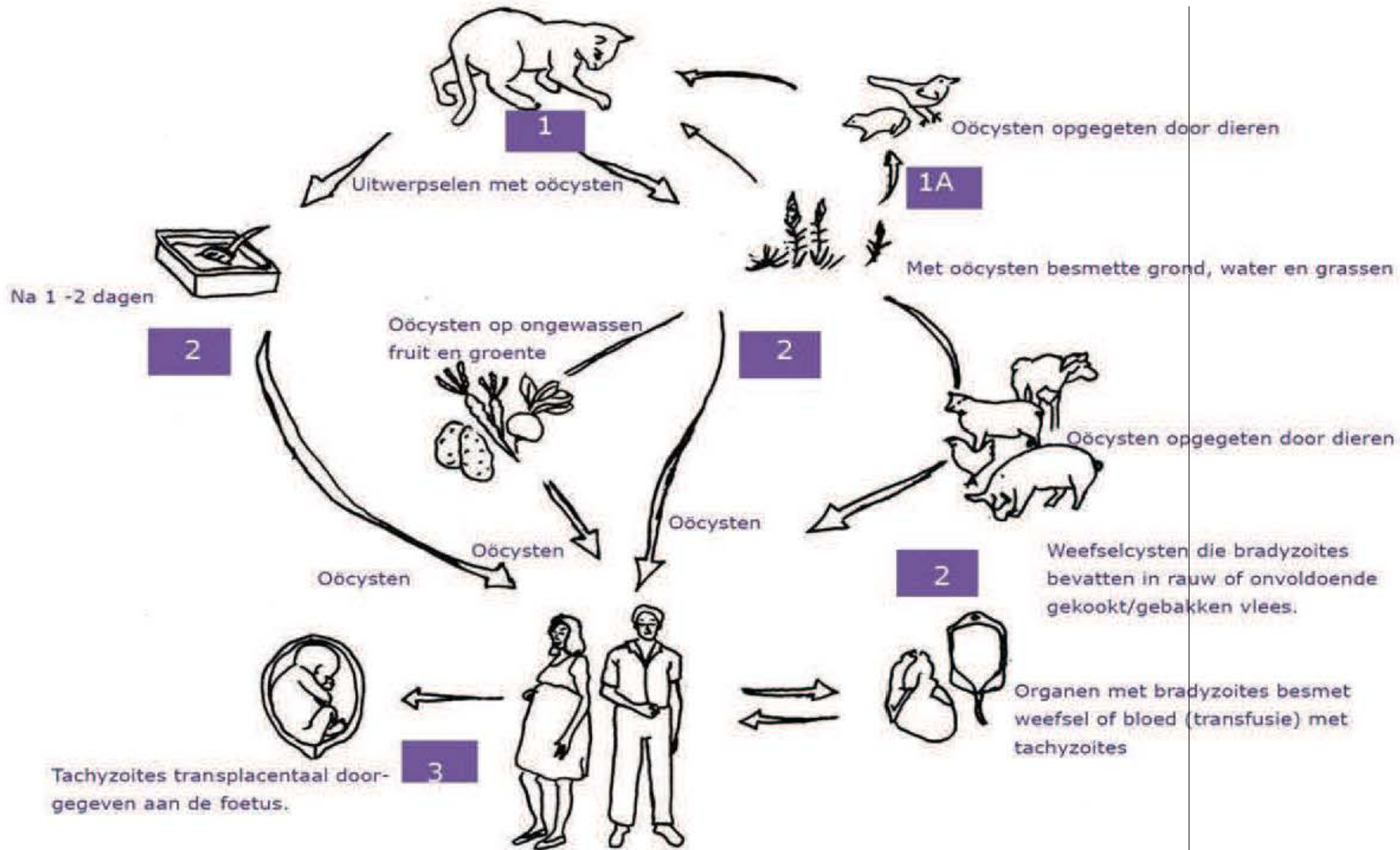
Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- 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.
- 

*Toxoplasma gondii* is de verwekker van de parasitaire infectie toxoplasmosis en is wereldwijd één van de meest voorkomende parasieten. *T. gondii* is in staat om alle warmbloedige vertebraten te infecteren. Naar schatting is ongeveer een derde van de wereldbevolking geïnfecteerd met de parasiet (Verma en Khanna, 2013). Zwangere vrouwen en immuun-gecompromitteerde mensen vormen de belangrijkste risicogroepen. Ook gezonde mensen kunnen geïnfecteerd worden, waarbij naast de meer zeldzame acute klachten zoals lymfklierzwellings en koorts, met name oogklachten voorkomen, die tot ernstige gezichtsstoornissen kunnen leiden. *T. gondii* is een voedselgerelateerde pathogeen met een zeer hoge ziektelast. De berekende ziektelast uitgedrukt in Disability-Adjusted Life-Years (DALY's) is in Nederland zelfs hoger dan die van een de andere belangrijke enteropathogeen Salmonella en ongeveer gelijk aan de ziektelast van Campylobacter (Havelaar et al. 2012).



## De cyclus van *Toxoplasma gondii*



*T. gondii* kent verschillende levensstadia. Na opname van *T. gondii* weefselcysten uit vlees, zullen de bradyzoieten vrijkomen in de darmtractus en vervolgens zullen vanuit de bradyzoieten de tachyzoieten worden gevormd. Deze tachyzoieten verspreiden zich door het lichaam naar alle weefsels. Door de afweerreactie die in het lichaam optreedt, lopen deze tachyzoieten uiteindelijk ergens vast en ontstaan er weefselcysten met daarin bradyzoieten. Deze weefselcysten vermenigvuldigen zich niet meer en blijven op hun plek. Ze kunnen jaren, tot levenslang, overleven (Dubey, 2010).

De mens kan geïnfecteerd raken door opname van oöcysten uit de omgeving en die afkomstig zijn van kattenuitwerpselen. Infectie kan ook door consumptie van rauwe of onvoldoende verhit vlees en vleesproducten en levende weefselcysten bevat (Dubey, 2010). In Europa lijkt vlees de belangrijkste bron van infectie (Cook et al. 2000).

Om het relatieve belang van de verschillende vleesproducten in kaart te brengen heeft het RIVM een QMRA-model (kwantitatieve microbiologische risicobeoordeling) ontwikkeld (Opsteegh et al. 2011). In dit model wordt op basis van het vóórkomen van *T. gondii* infectie bij de verschillende diersoorten, de afdoding door bereiding en de consumptiegegevens, voor ieder vleesproduct het aantal humane infecties voorspeld. Uit dit model blijkt dat 41% van de voorspelde infecties is toe te schrijven aan onverhitte vleesproducten (cervelaat, salami, filet américain, runderrookvlees, Suçuk droge Turkse worst, bacon, ontbijtspek, rauwe ham en theeworst). Op basis daarvan is een van de belangrijkste adviezen van het RIVM om rauwe vleesproducten in te vriezen (Opsteegh et al. 2011). Doordat er slechts beperkt gegevens beschikbaar waren over de afdoding van *T. gondii* bij de bereiding van de vleesproducten zijn om die reden alleen de processtappen vriezen, verhitten en zouten opgenomen in het model. Het is zeer waarschijnlijk dat methodes als roken, zuren, fermenteren en het gebruik van additieven ook effect heeft op de levensvatbaarheid van *T. gondii*, en dus is het aantal voorspelde infecties voor bepaalde producten waarschijnlijk overschat. Het invriezen van vlees is in veel gevallen niet wenselijk (overmatig dripverlies), heeft een negatief effect op de kwaliteit (verkleuring) en heeft mogelijke bezwaren bij afnemers (structuurverlies en hogere kosten).

Momenteel is het alleen mogelijk om te bepalen of met *T. gondii* besmet vlees nog een besmettingsrisico vormt, door middel van een dierproef (muisbioassay) (Dubey, 2010), maar grootschalig gebruik van deze methode is niet wenselijk vanwege het gebruik van proefdieren, tijdrovend en kostbaar. De huidige dierproefvrije methodes voor het aantonen van *T. gondii* (PCR, real time PCR of ELISA) kunnen geen onderscheid maken tussen levende en dode parasieten waardoor er geen conclusies getrokken kunnen worden.

Het doel van het project is het ontwikkelen en evalueren van een methode om onderscheid te maken tussen levende (en dus infectieuze) en dode *T. gondii*, waarvoor geen proefdieren nodig zijn. Vervolgens zal deze methode ingezet worden om het effect van procesbereiding bij de productie van commerciële vleesproducten te evalueren. Er zullen drie verschillende levend/dood methoden worden geëvalueerd en vervolgens wordt de meest geschikte methode ingezet om te testen of de gebruikte bereidingsmethoden in huidige vorm of met eventuele kleine aanpassingen, effectief zijn in het afdoden van *T. gondii* om hierdoor het risico voor mensen op een *T. gondii* besmetting te verminderen.

#### Literatuur

Cook, A.J., Gilbert, R.E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P.A., Foulon, W., Semprini, A.E., Dunn, D.T., 2000. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *Bmj* 321, 142-147.

Dubey, J.P., 2010. Toxoplasmosis of Animals and Humans. Second edition. CRC Press; 2010 313 pages. ISBN 978-1-4200-9236-3.

Havelaar, A.H., Haagsma, J.A., Mangen, M.J., Kemmeren, J.M., Verhoef, L.P., Vijgen, S.M., Wilson, M., Friesema, I.H., Kortbeek, L.M., van Duynhoven, Y.T., van Pelt, W., 2012. Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009. *International journal of food microbiology* 156, 231-238.

Opsteegh, M., Prickaerts, S., Frankena, K., Evers, E.G., 2011. A quantitative microbial risk assessment for meatborne *Toxoplasma gondii* infection in The Netherlands. *International journal of food microbiology* 150, 103-114.

### 3.2 Purpose

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

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

De doelstelling van dit project is het ontwikkelen en valideren van snelle en effectieve proefdiervrije methoden om onderscheid te maken tussen dode en levende *T. gondii* parasieten afkomstig uit vlees of vleesproducten. Deze methode zal vervolgens ingezet worden om te onderzoeken of de huidige procesmaatregelen voor bereiding van vleesproducten voldoende zijn om *T. gondii* af te doden of te inactiveren. De methode kan ook worden ingezet om procesmaatregelen aan te passen, zodat er veilige vleesproducten met optimaal behoud van kwaliteit worden geproduceerd. De methode zal verstrekt worden aan de partners voor toepassing in de praktijk.

### 3.3 Relevance

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

Op dit moment is het lastig om te bepalen of vleesproducten die *T. gondii* bevatten, ook daadwerkelijk levende en dus infectieuze parasieten bevatten. De huidige detectiemethoden maken veelal gebruik van het aantonen van DNA van de parasiet en zijn daardoor niet in staat om onderscheid te maken tussen dode en levende parasieten. Er is wel een test beschikbaar voor het aantonen van infectieuze *T. gondii*, maar deze duurt lang en is duur. Bovendien zijn er proefdieren (muizen) voor nodig. Een proefdiervrije test die onderscheid kan maken tussen dode en levende *T. gondii* heeft als voordeel dat ze veel gemakkelijker dan de muizen bioassay kan worden ingezet om het effect van procesmaatregelen te controleren. Dit betekent wellicht dat het advies om rauwe vleesproducten in te vriezen of te bereiden met ingevroren vlees, beperkt kan worden tot de producten waarvoor vast staat dat de bereiding niet effectief *T. gondii* dood. Als het vlees niet ingevroren hoeft te worden, scheelt dat de branche energie kosten waardoor duurzamere producten ontstaan. Daarnaast heeft niet invriezen een positief effect op de kwaliteit van de vleesproducten. Verder is het voordeel van een proefdiervrije methode voor het aantonen van infectieuze *T. gondii* een besparing van het aantal benodigde proefdieren, dit is een zeer gewenste ontwikkeling voor twee van 'de drie V's' (Vermindering en Vervanging). Op wetenschappelijk vlak is een uitbreiding van de levend/dood technologie voor *T. gondii* ook van belang omdat de kennis op dit vlak nog vrij beperkt is voor Toxoplasma. Kennis en methoden die in dit project worden opgedaan kunnen, na eventuele bescherming, gepubliceerd worden. Bovendien kunnen ze toegepast worden bij ander onderzoek naar Toxoplasma.

### 3.4 Research Strategy

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

Het project bestaat uit drie delen.

1. Het eerste deel is gericht op het ontwikkelen van (een) goed werkende in vitro methode(n) om onderscheid te maken tussen levende en dode *T. gondii*. Hiervoor zullen drie potentiële vervangende methoden voor de huidige bioassay voor het aantonen van de levensvatbaarheid van *T. gondii*

worden onderzocht en er zal worden nagegaan welke methoden goed werken. Deze drie methoden zijn: weefselkweek, een real-time PCR methode die gebruik maakt van PMA (propidium monoazide) methode en microscopische RTV (Real Time Viability) methode die gebruik maakt van fluorescentie.

2. In het tweede deel van het project zullen tien verschillende procesmaatregelen voor de bereiding van vleesproducten geselecteerd worden. Deze maatregelen zullen getest worden op hun effectiviteit om *Toxoplasma* af te doden in vleesproducten met de nieuw ontwikkelde in vitro methoden.

3. Vervolgens zullen de resultaten verkregen in het eerste en tweede deel van de studie gevalideerd worden met de gouden standaard voor onderscheid tussen levende en dode *T. gondii*, een 6 weken durende muizen bioassay. Daarvoor zal de detectielimiet van de nieuw ontwikkelde methode(n) bepaald worden en vergeleken worden met de muizen bioassay. Verder zullen de resultaten van het onderzoek naar de effectiviteit van de procesmaatregelen om *Toxoplasma* af te doden in vleesproducten bevestigd worden met de muizen bioassay. Daartoe zullen drie van de meest effectieve procesmaatregelen geselecteerd worden en getest worden in de nieuw ontwikkelde testen en in de muizen bioassay.

---

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.

---

Overzicht van het onderzoek op hoofdlijnen:

1. Ontwikkeling van drie levend / dood methodes op tachyzoieten. In deze fase zal er geen muizen bioassay uitgevoerd worden.

2. Ontwikkeling en optimalisatie van deze drie methoden op weefselcysten (bradyzoieten). In deze fase zal er geen muizen bioassay uitgevoerd worden.

3. Bepaling van de effectiviteit van tien procesmaatregelen voor de bereiding van vleesproducten om *Toxoplasma* af te doden. In deze fase zal er geen muizen bioassay uitgevoerd worden.

4. Bepaling detectielimiet van de levend/dood methode(n) op een reeks van lage tot hoge hoeveelheid weefselcysten (bradyzoieten) in vleesmonsters in de in vitro test methoden en bepaling van de detectielimiet op dezelfde monsters in de muizen bioassay. Daarnaast bevestiging van de resultaten van drie meest effectieve procesmaatregelen voor het afdoden van *Toxoplasma* in vleesproducten in de muizen bioassay. De muizen bioassay wordt tegelijkertijd uitgevoerd voor beide doelen.

---

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 het eerste drie delen van het project wordt de muizen bioassay nog niet gebruikt. Dit betreft de delen 1, 2 en 3 zoals beschreven in 3.4.2. Daarin worden de levend/dood testen ontwikkeld en geoptimaliseerd. Wanneer dit succesvol is afgerond komt in deel 3 de bepaling van de effectiviteit van 10 verschillende procesmaatregelen voor bereiding van vleesproducten. In het laatste deel (4) vindt een validatie plaats van de resultaten verkregen de drie voorgaande delen Voor de validatie zal de gouden standaard voor onderscheid tussen levende en dode *T. gondii*, de muizen bioassay gebruikt worden.

---

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	Bioassay op vleesmonsters gemengd met weefselcysten en met bradyzoieten en bioassay op vleesproducten bereid van Toxoplasma positief vlees.

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](http://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.	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="622 879 815 903">Serial number</th> <th data-bbox="1352 879 1697 903">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="622 911 640 935">1</td> <td data-bbox="1352 911 2058 1034">Bioassay op vleesmonsters gemengd met weefselcysten en met bradyzoieten en bioassay op vleesproducten bereid van Toxoplasma positief vlees.</td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Bioassay op vleesmonsters gemengd met weefselcysten en met bradyzoieten en bioassay op vleesproducten bereid van Toxoplasma positief vlees.
Serial number	Type of animal procedure					
1	Bioassay op vleesmonsters gemengd met weefselcysten en met bradyzoieten en bioassay op vleesproducten bereid van Toxoplasma positief vlees.					

## 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 muizenbioassay zal uitgevoerd worden zoals eerder uitgevoerd is voor het EFSA Toxoplasma project en beschreven is in het EFSA rapport van Opsteegh et al., 2016 in paragraaf 6.5 (Protocol of the mouse bioassay) blz. 151 ([www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/995e](http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/995e) ). De muizen worden gehouden onder BSL-2 condities. Ieder te testen inoculum wordt verdeeld over 2 muizen. De muizen kunnen ernstig ziek worden, dat is vooral tussen 10 en 14 dagen na infectie . Ernstig zieke muizen worden op basis van humane eindpunten geëuthanaseerd. Na zes weken wordt de proef beëindigd en worden alle muizen geëuthanaseerd. Hersenen en bloed wordt verzameld. De hersenen van de muizen worden onderzocht op Toxoplasma DNA met PCR en het bloed op antilichamen. Aanwezigheid van Toxoplasma DNA in de hersenen is de primaire uitkomstparameter, aanwezigheid van een antilichaam titer is indicatief voor een Toxoplasma infectie (Opsteegh et al., 2016 EFSA rapport).

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

---

- Eén week gewenning na aankomst.
- Voorafgaand aan inoculatie bloedtappen.
- Inoculatie 1 ml weefseldigest intra peritoneaal.
- Twee keer daags klinisch controleren na infectie tussen dag 8 tot 21 dagen. Er voor en er na één keer per dag klinisch controleren.
- Na 6 weken muizen euthanaseren (cervicale dislocatie). Hersenen en bloed verzamelen.
- Zieke muizen euthanaseren (cervicale dislocatie). Bij euthanasie na 3 dagen maar binnen 14 dagen na inoculatie peritoneaal vocht verzamelen. Bij euthanasie na 14 dagen bloed afnemen en hersenen verzamelen.

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

---

Er worden twee muizen gebruikt per monster. Het inoculum wordt verdeeld over beide muizen. De keuze voor twee muizen is dat wanneer één muis om wat voor reden dood gaat dan er nog de andere muis om een resultaat van de analyse van het monster te verkrijgen.

### B. The animals

---

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

---



**Diersoorten:** muizen. Zes weken oud bij aankomst. Vrouwelijke en mannelijke muizen.

Onderbouwing keuzes: deze werkwijze is beschreven in EFSA rapport Toxoplasma (Opsteegh et al., 2016).

Herkomst: ██████████

Type muis: gamma-interferon-knockout mice (GKO mice)

Inoculatie-route: i.p.

**De bioassay bevat uit twee delen:** in het eerste deel zal er een vergelijking plaatsvinden van de ontwikkelde in vitro test methoden en de bioassay op basis van een dosis-response curve. In het tweede deel zal de effectiviteit van procesmaatregelen voor afdoding van Toxoplasma in vleesproducten bepaald worden.

### **Bioassay (eerste deel): dosis response bradyzoiten en weefselcysten**

Om de detectielimiet te bepalen wordt een dosis response studie uitgevoerd. Daarvoor wordt een reeks bradyzoiten bereid van laag tot hoog. Deze reeks wordt getest in twee (**van de drie**) *in vitro* methoden (de weefselweek en de PMA methode) en in de bioassay.

Er is gekozen voor een reeks van 10 tot 10.000 bradyzoiten. Uit literatuur blijkt dat de detectielimiet (voor stam ME-49) in Swiss Webster muizen ongeveer 400 bradyzoiten is (Guo et al. 2016).

Er is gekozen om de detectielimiet te bepalen in PBS en in twee verschillende vleesdigesten. De nieuw ontwikkelde in vitro test zal gebruikt worden om levende *T. gondii* te bepalen in vleesproducten. De invloed van de matrix op de detectielimiet zal daarom ook bepaald worden.

#### **Bradyzoiten testen met weefselweek en PMA methode**

Dosis / matrix	Aantal proefgroepen	Aantal muizen
PBS	1	2
10, 100, 1000, 10.000 levende bradyzoiten in PBS (in duplo)	8	16
Vleesdigest schaap zonder spike	1	2
10, 100, 1000, 10.000 levende bradyzoiten in vleesdigest schaap (in duplo)	8	16
Vleesdigest rund (of varken) zonder spike	1	2
10, 100, 1000, 10.000 levende bradyzoiten in vleesdigest rund (of varken) (in duplo)	8	16
<b>Totaal</b>	<b>27</b>	<b>54</b>

De derde in vitro testmethode is een Real Time Viability (RTV) methode. Daarmee kunnen de bradyzoiten niet aangetoond worden. Wel is het mogelijk om weefselcysten aan te tonen. Om de resultaten van de RTV methode te valideren worden levende en dode weefselcysten getest in de RTV methode en in de bioassay.

**Weefselcysten testen met Real Time Viability**

Levende weefselcysten: 10, 100	2	4
Afgedode weefselcysten: 10, 100	2	4
<b>Totaal muizen</b>	<b>4</b>	<b>8</b>

**Bioassay (tweede deel): bevestiging van effectiviteit procesmaatregelen:**

Er zal Toxoplasma geïnfecteerd vlees, Toxoplasma gespiked vlees (met weefselcysten) en Toxoplasma-negatief vlees worden gebruikt om vleesproducten te bereiden. Drie verschillende procesmaatregelen zullen worden gebruikt om de vleesproducten te bereiden. De vleesproducten zullen worden getest in de muizenbioassay en de in vitro- test(en).

Groepen / matrix	Aantal proefgroepen	Aantal muizen
Geïnfecteerd vlees verdelen in 100g porties:		
• 2 x 100g onbehandeld	2	4
• 2 x 100g proces A	2	4
• 2 x 100g proces B	2	4
• 2 x 100g proces C	2	4
Gespiked vlees verdelen in 100g porties:		
• 2 x 100g onbehandeld	2	4
• 2 x 100g proces A	2	4
• 2 x 100g proces B	2	4
• 2 x 100g proces C	2	4
Negatief vlees verdelen in 100g porties:		
• 1 x 100g onbehandeld	1	2
• 1 x 100g proces A	1	2
• 1 x 100g proces B	1	2
• 1 x 100g proces C	1	2
<b>Totaal muizen</b>	<b>20</b>	<b>40</b>

**Reserve muizen**

Muizen kunnen als gedurende de eerste drie dagen na inspuiten doodgaan. Meest waarschijnlijke oorzaak daarvoor is een bacteriele besmetting van het materiaal. Een periode van drie dagen is in de beginfase van de Toxoplasma infectie en nog te kort om deze te kunnen diagnosticeren. Om die reden wordt een andere muis met restant van hetzelfde monstermateriaal ingespoten. De kans dat muizen binnen 3 dagen doodgaan is relatief klein maar is niet uitgesloten. Om die reden wordt gekozen voor een aantal reserve muizen. Een aantal van 6 muizen wordt voldoende geacht. Het totale aantal muizen is  $54+8+40+6 = 108$ .

---

### **C. Re-use**

---

Will the animals be re-used?

---

No, continue with question D.

---

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

---

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

---

No

---

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

---

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

---

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

Vervanging: De bioassay is nodig voor bepaling van het onderscheid tussen levende en dode Toxoplasma parasieten. De in vitro methoden die in dit onderzoek worden ontwikkeld maken het gebruik van de bioassay voor deze toepassing niet meer nodig. Vermindering: Twee muizen wordt als minimum gezien voor uitvoering van een bioassay. Voorafgaand aan het muizenexperiment wordt zowel de gevoeligheid van de in vitro methoden en de effectiviteit van de procesmaatregelen bepaald op basis van de in vitro methoden zelf. Op die manier wordt het aantal groepen in het validatie experiment met muizen beperkt tot doses rondom de detectielimiet en procesmaatregelen die effectief bleken op basis van de in vitro methode. Verfijning: De klinische verschijnselen worden genoteerd aan de hand van een gedifferentieerd scoringssysteem gericht op verandering van houding/gedrag en uiterlijk (conditie van de vacht). De humane eindpunten zijn daar ook op gebaseerd. Onnodig lijden wordt voorkomen door gebruik van dit scoringssysteem.

---

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

De gezondheid van de dieren wordt twee keer per dag (zie voor details onderdeel A) beoordeeld op basis van een score lijst. Houding/gedrag en conditie vacht wordt beoordeeld. Elk verschijnsel wordt beoordeeld met een score. De humane eindpunten zijn gebaseerd op deze scores.

## 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.

---

De dosis-response curve voor infectie van muizen met bradyzoiten van type II T. gondii is in verschillende eerdere experimenten bepaald en de gegevens uit de literatuur zijn worden geanalyseerd in Guo et al., 2015. Zij komen uit op een ID50 (d.w.z. dosis waarbij 50% van de muizen geïnfecteerd raakt) van 462 (exponentieel model) of 348 (beta-Poisson model) bradyzoiten. Het primaire doel van ons experiment is niet om de detectielimiet van de muizenbioassay opnieuw vast te stellen, wij willen de detectielimiet van de in vitro viability testen bepalen en vergelijken met de muizenbioassay. Voor een goede vergelijking kan niet worden volstaan met gegevens uit de literatuur, maar is het nodig de muizenbioassay parallel aan de in vitro testen uit te voeren.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

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

---

No

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

---

### G. Location where the animals procedures are performed

---

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

---

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

---

## **G. Location where the animals procedures are performed**

---

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

---

## **Classification of discomfort/humane endpoints**

### **H. Pain and pain relief**

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

No > Continue with question I.

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

---

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

---

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

---

Het valt te verwachten dat de muizen pijn krijgen als gevolg van de infectie. Dit komt tot uiting in verandering van gedrag, houding en uiterlijk van de muis. De humane eindpunten zijn hierop gebaseerd.

Om pijn en angst te bestrijden zal buprenorphine (0.05 mg/kg muis) worden toegediend aan de muizen via het drinkwater. Toediening hiervan vermindert de angst en pijn maar niet de uitkomst van een acute Toxoplasma infectie (Lindsay et al., 2005, The Journal of parasitology 91, 1488-1490).

### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

---

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

---

Muizen kunnen na een ip infectie ascitis vormen in de buikholte als gevolg van groei van tachyzoieten. Muizen kunnen twee weken na infectie doodgaan als gevolg van pneumonie of een encephalitis. Daarna verdwijnt de parasiet uit de organen en manifesteert deze zich in de hersenen (Dubey 2010).

Explain why these effects may emerge.

---

Bij een peritonitis binnen 3 dagen na toediening kan er sprake zijn van een bacteriële infectie. Oorzaak hiervan is dat organen en weefsels bacteriologisch verontreinigd kunnen zijn. Als gevolg daarvan kunnen er ook bacterien in het weefseldigest aanwezig zijn. Infectie met Toxoplasma kan leiden tot een peritonitis, een pneumonie of een encephalitis.

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

---

Om bacteriële infecties te voorkomen wordt er een antibioticum-cocktail toegevoegd aan het weefseldigest, deze antibiotica (penicilline-streptomycine, amoxicilline) hebben geen effect op Toxoplasma. Als een muis binnen 3 dagen doodgaat dan is de kans het grootste dat dit is vanwege een bacteriële infectie. In dat geval zal met hetzelfde digest een andere muis geïnoculeerd worden. Zie ook paragraaf B over het gebruik van reservemuizen. Toepassing van humane eindpunten (zie hieronder).

## **J. Humane endpoints**

---

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

---

No > Continue with question K.

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

---

De muizen worden geëuthanaseerd bij uitzichtloos of ernstig lijden. Een coderingslijst voor HEP's wordt gebruikt zoals gebruikt voor het Toxoplasma EFSA project in 2015 en beschreven in het EFSA rapport van Opsteegh et al., 2016 ([www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/995e](http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/995e) ) Muizen worden geëuthanaseerd als een muis een maximum score heeft bereikt in categorie A (score 2) of B (cumulatieve score 3) of als een muis totale score (A+B) van 3 heeft gedurende drie achtereenvolgende dagen. Categorie A (conditie vacht) 0 = gladde (aansluitende) glimmende vacht 1 = ruwe (opgezette) vacht 2 = stijve vacht, blijft opgezet Categorie B (houding/gedrag) 0 = alert en actief 1 = ineengedoken en bolle rug tijdens het lopen 1 = passief tijdens handelingen 1 = wankelende gang (incoördinatie)

---

Indicate the likely incidence.

---

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 ).

---

Dit is een matig ongerief. Toepassen van HEP's zal ernstig ongerief voorkomen.

## End of experiment

### L. Method of killing

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

---

Bloed en hersenen zullen verzameld worden. Deze zijn nodig voor diagnostiek van Toxoplasma.

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

---

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

---

Yes

---





Postbus 65 | 8200 AB Lelystad

Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Wageningen  
University & Research

DATUM  
23 mei 2017

ONDERWERP  
aanvraag projectvergunning  
AVD401002017896

ONS KEUWMERK  
AVD401002017896

Geachte CCD,

Onderstaand het advies dat de DEC-WUR heeft gegeven aangaande het project  
"Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten  
in vlees met de muis bioassay"

#### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD401002017896**
2. Titel van het project: Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassay
3. Titel van de NTS: Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassay
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:  
DEC-WUR  

6. Adviestraject  
Ontvangen door DEC: 24-04-2017  
Aanvraag compleet: 24-04-2017  
In vergadering besproken: 15-05-2017  
Termijnonderbreking(en) van / tot: geen  
Aanpassing aanvraag: 17-05-2017  
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  
De DEC heeft enkel 2 suggesties gedaan voor tekstuele aanpassingen.

INTERNET  
[www.wur.nl](http://www.wur.nl)

KVK NUMMER  
09098104

CONTACTPERSOON  
ing. I.E. Leushuis-Kappers

TELEFOON  
+31 (0)320-238170

E-MAIL  
[DEC@wur.nl](mailto:DEC@wur.nl)

**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 doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling./ aangekruiste doelcategorieën in overeenstemming zijn met de hoofddoelstellingen.

*Belangen en waarden*

4. Het directe doel is het vergelijken van nieuwe (in vitro) methoden met een bestaande in vivo methode voor het detecteren van toxoplasma parasieten. Het uiteindelijke doel is de huidige testmethode waarbij muizen gebruikt worden te vervangen door een test die net zo goed is maar waar echter geen proefdieren voor nodig zijn. Met die nieuwe testmethode zullen huidige procesmaatregelen voor bereiding van vleesproducten geëvalueerd worden.
5. De belanghebbenden in het project en hun morele waarden zijn:
  - Toekomstige proefdieren: vermindering van hun aantal
  - Proefdieren: aantasting van welzijn en integriteit
  - Onderzoeker/CRO: economisch belang
  - Producent in vitro test: economische belang
  - Consument: voedselveiligheid en milieu
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.

*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 vooruitstrevend omdat naar vervangingsmethoden gezocht wordt. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in de ogen van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

*Welzijn dieren*

9. Er is geen sprake van de bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "matig" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit: i.p.-toediening van parasieten en ziekteverschijnselen van toxoplasma-infectie. In essentie is er kans op ernstig ongerief maar de HEP's zijn goed gedefinieerd om dit te voorkomen. Verder wordt er standaard pijnbestrijding via het drinkwater gegeven.
12. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier, anders dan voortvloeiend uit de proefbehandeling.
13. De DEC heeft vastgesteld dat de criteria voor humane eindpunten goed en navolgbaar 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. Voordat overgegaan wordt tot in vivo onderzoek wordt eerst een uitgebreide in vitro voorscreening gedaan. Verder is dit project juist gebaseerd op vervanging.
15. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De DEC ziet geen extra mogelijkheden voor verfijning, anders dan die de onderzoeker nu toepast.

DATUM

23 mei 2017

ONS KENMERK

AVD401002017896

PAGINA

3 van 4

*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 gedood in het kader van het project. Dit is noodzakelijk voor behalen doelstellingen omdat men onderzoek aan bloed, hersenen en organen wil uitvoeren. De dieren worden gedood volgens een passende methode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

## NTS

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

**D. Ethische afweging**

1. De centrale morele vraag van het project is: weegt het doen van onderzoek of toxoplasma parasieten gevonden kunnen worden m.b.v. in vitro alternatieven zodat uiteindelijk in vitro (i.p.v. in vivo) getest kan worden op voedselveiligheid voor de mens op tegen het gebruik van 108 muizen die maximaal matig ongerief ondervinden.
2. In de afweging heeft de DEC geconstateerd dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft in haar afweging meegewogen dat als het onderzoek zijn uiteindelijke doel haalt het vervangen huidige in vivo assay kan vervangen door een net zo goed in vitro-alternatief. Hierdoor wordt proefdiergebruik verminderd. De DEC heeft dit gewogen als een reëel belang voor de toekomstige proefdieren. Daarnaast ziet de DEC hier een belang voor de maatschappij; het project draagt bij aan een breed gedragen wens om meer met minder proefdieren te doen. Aanvullend worden met de nieuwe methode ook procesmaatregelen geëvalueerd. De DEC heeft dit meegewogen dit als een reëel belang. De onderzoeker/CRO heeft een economisch belang. De DEC heeft deze economische waarde meegewogen als een beperkt belang. Als het in vitro model effectief en geïmplementeerd is, heeft de consument ook een voordeel. Dat is gerelateerd aan de waarden van voedselveiligheid en (een veilig) milieu. Ook producent hebben daarbij een belang. De DEC heeft deze belangen in het kader van dit project ingeschat als reëel. Tot slot zijn de waarden van de proefdieren in het geding. Zij ervaren maximaal matig ongerief als gevolg van de handelingen binnen dit project. De integriteit wordt in dit project niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef.
3. Op basis van bovenstaande overwegingen is de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar het zoeken van een in vitro-alternatief voor een bestaande in vivo toxoplasma assay met maximaal matig ongerief voor maximaal 100 muizen. De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.

DATUM

23 mei 2017

ONS KEUWERMERK

AVD401002017896

PAGINA

4 van 4

**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.





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research

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  
AVD401002017896

**Bijlagen**

2

Datum 25 april 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 24 april 2017. Het gaat om uw project "Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassay". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD401002017896. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

### **Wacht met de uitvoering van uw project**

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

### **Factuur**

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

**Meer informatie**

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

**Datum:**

25 april 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD401002017896

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**

25 april 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD401002017896

**Gegevens aanvrager**

## Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 40100  
Naam instelling of organisatie: Stichting Wageningen Research  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 9098104  
Straat en huisnummer: Akkermaalsbos 12  
Postbus: 59  
Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN  
IBAN: NL10RABO0397066465  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Wageningen UR

## Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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



**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?

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

**Datum:**

25 april 2017

**Aanvraagnummer:**

1002017896

**Over uw project**

Geplande startdatum:

1 augustus 2017

Geplande einddatum:

31 juli 2022

Titel project:

Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassy

Titel niet-technische samenvatting:

Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassy

Naam DEC:

DEC Wageningen UR

Postadres DEC:

Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen

E-mailadres DEC:

dec@wur.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen:

€ 1035,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting

**Ondertekening**

Naam:

[Redacted]

Functie:

[Redacted]

Plaats:

Wageningen

Datum:

25 april 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen University and 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  
AVD401002017896  
**Bijlagen**  
2

Datum 25 april 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 25 april 2017  
Vervaldatum: 25 mei 2017  
Factuurnummer: 170896  
Ordernummer: WUR1055480

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD401002017896	€ 1035,00

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research

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  
AVD401002017896

**Bijlagen**

1

Datum 6 juni 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 24 april 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassy" met aanvraagnummer AVD401002017896. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

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

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

U kunt met uw project "Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassy" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 augustus 2017 tot en met 31 juli 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. Dit advies is opgesteld op 23 mei 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

**Datum:**  
6 juni 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD401002017896

**Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

**Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven



**Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

**Naam:** Stichting Wageningen Research

**Adres:** Postbus 59

**Postcode en plaats:** 6700 AB WAGENINGEN

**Deelnemersnummer:** 40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 augustus 2017 tot en met 31 juli 2022, voor het project "Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassy" met aanvraagnummer AVD401002017896, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. 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 24 april 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 mei 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 mei 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 23 mei 2017, ontvangen op 23 mei 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1 Bioassay op vleesmonsters gemengd met weefselcysten en met bradyzoieten en bioassay op vleesproducten bereid van Toxoplasma positief vlees.</b>				
	Muizen (Mus musculus) / Gamma-interferon-knockout mice	108	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:**  
AVD401002017896

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:**

AVD401002017896

## 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 onvereenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn

**Aanvraagnummer:**  
AVD401002017896

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

#### **Einde van een dierproef**

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

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

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

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

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