

Inventaris Wob-verzoek W17-11										
nr.	document NTS 20171047	wordt verstrekt				weigeringsgronden				
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x			
2	NTS initieel			x						
3	Projectvoorstel initeel				x	x	x	x		
4	Figuur 1			x						
5	Figuur 2			x						
6	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x	x	x	x		
7	Bijlage beschrijving dierproeven 2 initieel				x		x			
8	Bijlage beschrijving dierproeven 3 initieel				x		x			
9	Bijlage beschrijving dierproeven 4 initieel				x		x			
10	DEC-advies				x		x			
11	Ontvangstbevestiging				x		x			
12	Aanvullende informatie				x		x			
13	NTS aangepast	x								
14	Projectvoorstel aangepast				x	x	x	x		
15	Figuur 2 aangepast			x						
16	Bijlage beschrijving dierproeven 2 aangepast				x		x			
17	Bijlage beschrijving dierproeven 3 aangepast				x		x			
18	Bijlage beschrijving dierproeven 4 aangepast				x		x			
19	Adviesnota CCD		x							x
20	Beschikking en vergunning				x		x			
21	Verzoek herziening beschikking				x		x			
22	Herziene beschikking				x		x			

1047



18 MEI 2017

## 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl) of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 80100 KNAW plaats van uitvoering: ██████████ <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 ██████████ Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde KNAW ██████████ KvK-nummer 54667089
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer Postbus 19121 Postcode en plaats 1000GC Amsterdam IBAN Tenaamstelling van het rekeningnummer ██████████
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters ██████████ ██████████ Functie Groepsleider Afdeling ██████████ Telefoonnummer ██████████ E-mailadres ██████████
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. (Titel) Naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer E-mailadres

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |              |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 6 - 2017 |
| Einddatum  | 1 - 6 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- The cellular and molecular basis of the hematopoietic production
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De cellulaire en moleculaire basis van de vorming van bloedvormende stamcellen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                                    |
|-------------|------------------------------------|
| Naam DEC    | DEC-KNAW                           |
| Postadres   | Meibergdreef 47, 1105 BA Amsterdam |
| E-mailadres | decsecr@knaw.nl                    |

## 4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1684 Lege
- Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.

- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur

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

## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

- Melding Machtiging
- 

## 6 Ondertekening

6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

[Redacted]

Functie

[Redacted] - KNAW

Plaats

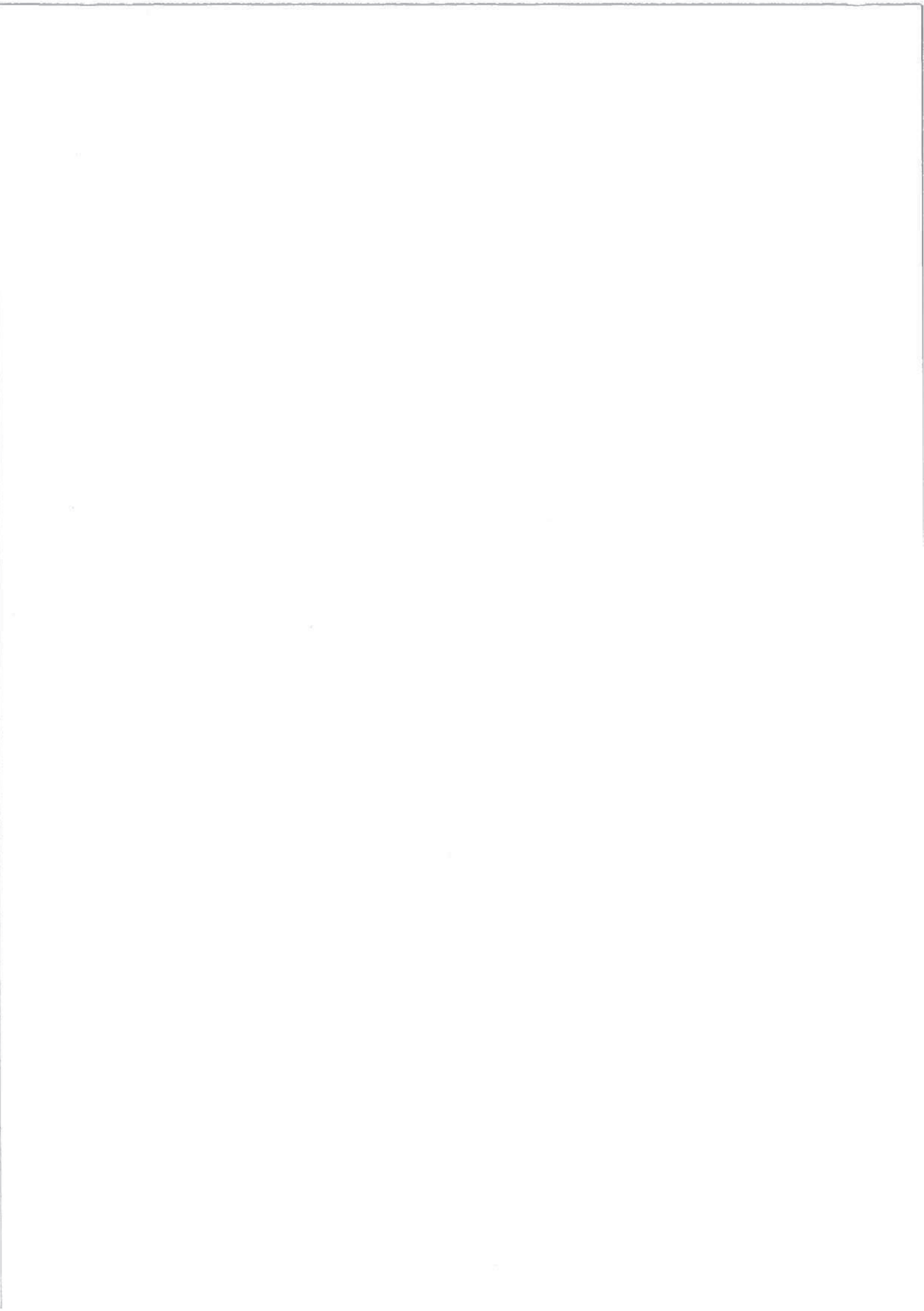
Amsterdam

Datum

15 - 5 - 2017

Handtekening

[Redacted]





## Format

### Niet-technische samenvatting

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

### 1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	De cellulaire en moleculaire basis van de vorming van bloedvormende stamcellen
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	bloedvorming , stamcellen, genregulatie, muis, zebravis

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Elke dag produceren bloedvormende stamcellen (<i>hematopoietic stem cells</i> ofwel HSC) miljarden nieuwe bloedcellen. Defecten in HSC leiden tot verscheidene bloedgerelateerde aandoeningen (zoals bloedarmoede) en soorten kanker (zoals leukemie).</p> <p>De transplantatie van gezonde HSC is een belangrijk deel van de behandeling van bloedziektes. Soms is het voor de patiënten de enige mogelijke behandeling. De vraag naar stamceltransplantatie groeit, maar het is echter heel moeilijk de juiste donors te vinden. Daardoor is er een tekort aan HSC, wat een groeiend probleem is. Ondanks enorme inspanningen lukt het tot dusverre maar matig om nieuwe bronnen van HSC <i>in vitro</i> te genereren. Door de beperkte kennis van het natuurlijke productieproces (in vivo) is het moeizaam om HSC in een laboratoriumsituatie (in vitro) te</p>
---	--

kweken.

Het doel van dit project is meer inzicht te krijgen in de *in vivo* HSC-productie, noodzakelijk om in de toekomst HSC *in vitro* te kunnen kweken.

- |     |   |   |
|-----|---|---|
| 3.2 | Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | Wetenschappelijk belang: inzicht krijgen in de processen die betrokken zijn bij de productie en de regulatie van bloedvormende stamcellen.<br>Maatschappelijk belang: Meer kennis over HSC-productie <i>in vivo</i> is van belang om <i>in vitro</i> kweken van HSC in de toekomst mogelijk te maken. De HSC zijn nodig in de kliniek voor het behandelen van patiënten met bloedgerelateerde ziekten.  |
| 3.3 | Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?  | Muis: 12015<br>Zebravis: 4992   |
| 3.4 | Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?                                     | Sommige dieren zullen worden gebruikt om donorcellen / weefsel te leveren die moeten worden getest. De overige dieren worden gebruikt als ontvangers van donorcellen en -weefsel. Om de donorcellen te testen, moeten we transplantaties uitvoeren bij dieren (ontvangers) die op lange termijn worden geanalyseerd (het in kaart brengen van de resultaten van onze experimenten).<br><br>Kortdurend licht ongerief wordt verwacht als gevolg van het toedienen van stoffen, bijvoorbeeld door het geven van injecties (geen overlast door de gevolgen ervan). Licht ongerief wordt in een aantal gevallen ook verwacht door een kleine ingreep. In sommige gevallen zal een operatie worden uitgevoerd op een zwangere muis, wat een matig ongerief zal veroorzaken (bijvoorbeeld implantatie van genetisch gemodificeerde embryo's bij zwangere vrouwtjes).<br><br>De meeste dieren in dit project zullen maximaal licht ongerief ondervinden; een aantal matig ongerief ten gevolge van de operaties. |
| 3.5 | Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?   | Muis: 3240 (matig ongerief, 27%), 8775 (licht ongerief, 73%)<br>Zebravis: 4,992 (100%, licht ongerief)  |
| 3.6 | Wat is de bestemming van de dieren na afloop?   | Zowel de muizen als zebravissen worden geëuthanaseerd, waarna het weefsel uitgebreid wordt geanalyseerd.  |

## 4 Drie V's

- |     |  |   |
|-----|--|---|
| 4.1 | <b>Vervanging</b><br>Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden. | Om het aantal dierproeven tot een minimum te beperken, hebben we weefsels en cellen van dieren <i>in vitro</i> geanalyseerd. Zo kan gericht worden bepaald welke dierproeven nodig zijn.<br>De complexe processen die betrokken zijn bij de productie van bloedvormende stamcellen worden bestudeerd in een levend organisme zodat de conclusies relevant zijn voor de mens. Deze complexe processen kunnen nog niet <i>in vitro</i> worden nagebootst. |
|-----|--|---|

#### 4.2 **Vermindering**

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

Op basis van onze eerdere data, een goede statistische basis en een goede uitvoering van experimenten, in combinatie met jarenlange ervaring, kunnen wij strikt wetenschappelijke studies met een minimaal aantal dieren uitvoeren. Er zullen zoveel mogelijk *ex vivo* analyses gecombineerd op de verkregen weefsels van een enkel dier om zo het aantal dieren te beperken tot het benodigde minimum. Zebravissen en muizen worden internationaal veelvuldig gebruikt voor onderzoek, waardoor een eenvoudige vergelijking te maken is met de gegevens uit andere studies. Hierdoor wordt herhaling voorkomen.

#### 4.3 **Verfijning**

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

De dierexperimenten zullen worden uitgevoerd met muizen en zebravissen. Voor deze proefdieren geldt dat de kennis en expertise om het onderzoek uit te voeren groot zijn. Beide soorten zijn uitermate geschikt voor de studie van biologische processen. Beide diersoorten hebben elk hun eigen specifieke voordelen, zodat de studieopzet optimaal kan worden verfijnd.

We gebruiken verschillende diersoorten om factoren/mechanismen te vinden die de productie van bloedstamcellen regelen en bovenal belangrijk zijn in alle diersoorten. Dergelijke factoren / mechanismen zullen zeer waarschijnlijk ook in de mens een rol spelen.

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

De dieren krijgen adequate anesthesie en pijnbestrijding. De muizen en zebravissen worden dagelijks gecontroleerd op welzijn. De experimenten worden uitgevoerd door gekwalificeerd en bevoegd personeel. De omstandigheden waaronder het lijden van een proefdier actief moet worden beëindigd door euthanasie zijn nauwkeurig vastgelegd.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen





## Form Project proposal

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

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

Every day, blood stem cells (also named hematopoietic stem cells or HSCs) produce billions of new blood cells, which are needed for an organism to survive. This massive cell production is possible due to two important properties inherent in HSCs, multipotency and self-renewal. The multipotency property allows single HSCs to produce all the different blood cell types (e.g. erythrocytes that carry oxygen in tissues,

platelets that provide coagulation in case of bleeding, lymphocytes that protect the organism against infections). The self-renewal property allows HSCs to produce all blood cells without exhaustion of the HSC pool, which remains constant during life. These inherent properties confer to HSCs the capacity to maintain blood homeostasis under physiological condition. HSCs play also a crucial role in the clinic. Indeed, defects in HSCs lead to blood-related disorders and various cancers (e.g. anemia, leukemia). The transplantation of healthy donor HSCs to replace the patient defective ones is an important part of the treatment and sometimes the only cure. However, less than 30% of the patients have matched donors in their family. Therefore, successful transplantation in most patients relies on finding unrelated volunteer donors with the highest compatibility (the chance of an optimal match being very low)<sup>1</sup>. Since the number of transplantations increases every year, the limitation in compatible HSCs available for transplantation procedures has become a major hurdle. More over, HSCs are very rare cells present in bone marrow, cord blood and mobilized peripheral blood (all tissues being used as source of HSCs in clinic). To circumvent the HSC shortage, research efforts have been made to expand donor HSCs *ex vivo* or to generate new sources of HSCs *in vitro* (e.g. from pluripotent stem cells or somatic cells)<sup>2</sup>. Despite some progresses, success has been limited and it remains impossible to date to produce large quantities of tailor-made HSCs. Because HSC production, as it occurs *in vivo*, is not fully understood yet, it is very difficult to mimic this process *in vitro*. To circumvent this issue, it is crucial (1) to better characterise the HSCs and their precursors, and (2) to identify the intrinsic factors (e.g. transcription factors) and extrinsic factors (e.g. growth factors provided by the surrounding microenvironment) that promote and regulate HSC fate determination, generation and expansion *in vivo*.

Adult HSCs are initially produced during embryonic development. They are first generated in the main arteries (aorta, vitelline and umbilical arteries) of the embryo<sup>3-5</sup> (**Fig. 1A**). They derive from hemogenic endothelial cells that are embedded in the arteries' wall<sup>6,7</sup> (**Fig. 1B**). The dynamic transition of an endothelial cell into a HSC has been observed in the aorta of chicken, mouse and zebrafish embryos<sup>8,9,10,11</sup>. Such finding demonstrated the conservation of the HSC production process in between species and the importance of the aorta microenvironment in supporting/regulating this important process. In arteries, HSCs are part of cell clusters<sup>12</sup> that will then colonize the fetal liver and placenta where the pool of HSCs expands before colonizing the bone marrow before birth (**Fig. 1A,B**). The important role of the endothelium in HSC production was an important fundamental discovery that paved the way to improve HSC production *in vitro*. For example, *in vitro* vascular induction was recently used to successfully reprogram human endothelial cells in HSC-like cells<sup>13</sup> and to induce mouse embryo aorta endothelial cells into HSC-like cells<sup>14</sup>. The produced cells are named HSC-like cells because it remains difficult to present to generate large quantities of fully functional HSCs that are able to engraft and to provide a long-term multilineage hematopoietic reconstitution when transplanted in adult recipients (the assay to experimentally identify HSCs). Therefore, research must continue to understand how a cell becomes a HSC, how it is regulated and how HSCs can expand without losing their stemness (**Fig. 1C**).

The **main research goal** in my lab is to better understand the production of HSCs, as it occurs *in vivo* during embryonic life. Our **sub-goal 1** is to determine the anatomical origin (intra- or extra-embryonic) of hemogenic endothelial cells (the cells producing HSCs). So far, it is uncertain because the blood is already circulating at the time of HSC detection in the embryo. Therefore, it cannot be excluded that hemogenic endothelial cells (or their precursors) emerge in one site and reach another anatomical site via the circulation or throughout tissues before to actually produce HSCs. It is an important sub-goal since the microenvironment of their site of origin determines the fate of these cells. Our **sub-goal 2** is to understand the function of specific genes in HSC production during embryonic life. HSC emergence and expansion are highly regulated processes both in time (as it occurs at specific time points of development) and space (in restricted regions of the vessels and organs) (**Fig. 1A**). However, the complex network of extrinsic and intrinsic regulatory factors involved *in vivo* in HSC production is still poorly understood. Our **sub-goal 3** is to find new markers for HSCs and cells from the supportive microenvironment to be able to precisely localise and follow the fate and behaviour of these cells during development.

The state-of-affairs on the production of HSCs *in vitro* is a worldwide concern since it remains impossible to achieve so far, despite extensive research. Understanding the process as it occurs *in vivo* is a very important research topic that several international labs are trying to achieve. However, only few labs study the embryonic development when the first HSCs are generated. Moreover, we are most likely the only lab able to perform a multi-species comparative study since we have the unique expertise, state-of-the-art technology and full access to the three most relevant animal models in the lab (i.e. chicken, mouse and zebrafish).

The use of the different animal models is needed because:

(i) They are complementary models. Indeed, each animal model allows different *ex vivo* analyses due to different technical advantages. For example, live imaging and cell tracing can only be performed in zebrafish embryos. Also, tissue grafting can only be performed with chicken embryos while HSC transplantation is used in the mouse and zebrafish models.

(ii) The use and comparison of different animal models allow finding conserved processes and mechanisms in between species. It reinforces the possibility that such processes and mechanisms also occur in human. In this project, chicken, mouse and zebrafish embryos will be used as reliable alternatives to human embryos to analyse in details the different aspects of HSC production during embryonic life.

(iii) The study of developmental hematopoiesis cannot be performed in human embryos due to the difficulty to access human embryo samples. When available, such samples are rare and often damaged because of the embryo collection procedure (i.e. from abortion). The use of human embryo is not a possible/realistic alternative for our project. The only alternative is to use animal models instead.

(iv) There is an increased request from the scientific community to provide and compare data in different animal models (e.g. for publication).

Because there is no need of licence to work on chicken embryos (no adult chicken will be used for the project), the requested licence only concerns the mouse and zebrafish models. Our three sub-goals are of equivalent importance. Therefore, our strategy is to conduct experiments in all three animal models in parallel to answer all sub-goals (and not sequentially since all models will provide, via different assays and *ex vivo* analysis, pieces of answers to the same question).



[REDACTED]

[REDACTED]



are functionally important during the successive steps of HSC production (such as endothelial cell specification into hemogenic endothelial cells, endothelial to hematopoietic transition, pre-HSC maturation, HSC survival and expansion). The goal of using and comparing different animal models (chicken, mouse, zebrafish) is to find conserved HSC regulators that will therefore most likely be involved also in human. Ultimately this knowledge should lead in the future to the production of tailor-made HSCs that are needed to treat patients who suffer from hematopoietic disorders and diseases.

**Our main goal is to identify the molecular and cellular mechanisms involved in HSC production and regulation during the embryonic development of zebrafish, mouse and chicken** (the three main and most reliable animal models used to study developmental hematopoiesis).

**Our specific research sub-goals are:**

**1- To determine the anatomical origin of hemogenic endothelial cells (or precursors).**

We wish to identify the anatomical site (yolk sac, allantois or embryo proper) at the origin of hemogenic endothelial cells (or precursors). We expect to identify within the 5 years of the project the microenvironment that determines the fate of hemogenic endothelial cells, which produce later on HSCs.

**2- To understand the function of specific genes in HSC production during embryonic life under basal conditions by looking at the effect on cell specialization, emergence, viability, maturation, proliferation and differentiation.**

We wish to identify the genes involved in the regulation of HSC production and we expect to prove their functionality within the 5 years of the project.

**3- To find new markers for HSCs and cells from the supportive microenvironment.**

We wish to identify new markers to better identify, isolate and locate HSCs and the cells in the surrounding microenvironment that constitute a supportive niche. We expect to identify new markers within the 5 years of the project.

This research will be performed in a lab, [REDACTED]

[REDACTED] The institute houses large zebrafish and mouse facilities, provides core facilities for various high-end techniques (e.g. sequencing, histology, confocal microscopy, flow cytometry), and expertise on animal models with dedicated and experienced animal caretakers. As principle investigator for this project, I have more than 20 years of experience with the use of the mouse model and 2 years with the zebrafish model, in biomedical research. In the lab, we have one dedicated *in vivo* technician and very experienced scientists that oversee the breeding of all animal lines, experiments and procedures, and new people are trained when required. The research lab has experience with the different experiments and techniques that are proposed for the project (e.g. intra-uterus injection in embryos, intravenous injection in adult, embryos and tissues collection, whole embryo multicolour staining, immunostaining on cryosections, confocal imaging of embryo/tissue slices after immunostaining).

**There are several reasons why we think that we can achieve our objectives within 5 years:**

- Part of the research described here was included in research proposals that were reviewed by independent experts in the field and were granted for funding ([REDACTED] and were previously approved as DEC protocols. All animal procedures are currently being performed and are part of the ongoing projects. It is important to note, that there is overlap between the mouse studies described in this project and those in earlier DEC-approved protocols. After a license for this project has been obtained, all experiments will formally be executed under this new license.
- Work from my group on [REDACTED] has resulted in seminal papers that described the required techniques.
- Our research and experiments are continuously being evaluated by various other researchers within and outside our institute. The scientists working in my group are selected based on their excellence and their commitment to our goals.

Our previous achievements make it very likely that we will be able to finish the project proposal in 5 years.

---

### 3.3 Relevance

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

The proposed work will result in the identification of molecular and cellular processes that drive

hematopoietic stem cell (HSC) production in vivo. The **scientific relevance** of the objectives is to improve our fundamental scientific knowledge of the processes and mechanisms driving and regulating HSC and hematopoietic production in zebrafish, and mouse and chicken throughout development and in adult. The **social relevance** of our objectives is that we can use this knowledge in the future to improve HSC production and expansion in vitro and therefore to supply in tailor-made HSCs that are in such need to cure patients with blood related disorders and diseases. Allogeneic and autologous HSC transplantations are used widely in the treatment of hematologic and genetic conditions. Induced pluripotent stem (IPS)-derived HSCs could be an ideal source for resolving current limitations related to HSC transplantation procedures. Current efforts to derive HSCs from pluripotent stem cells have largely focused on recapitulating normal developmental progression in an ex vivo setting. Lessons can certainly be learned from the study of HSC production during embryonic development. In addition, an ability to generate bona fide HSCs from iPS lines derived from patients with genetic diseases could be invaluable for disease modelling and drug screening. It would certainly tremendously reduce research on animals and the need to collect cells from donors or embryos. Although generating human HSCs from pluripotent stem cells still remains elusive, a better understanding of the network of regulatory factors governing HSC identity and production as it occurs during embryonic development (our proposal goal) should help to overcome the current hurdles in generating functional (i.e. transplantable) HSCs.

---

### 3.4 Research strategy

---

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

---

A flowchart that summarizes the workflow of experiments is provided in attachment. Our research strategy is to study and compare the hematopoietic development in chicken, mouse and zebrafish embryos to find conserved mechanisms and regulatory genes. Parallel studies will therefore be performed in mouse, zebrafish and chicken species. For chicken embryo experiments, no AP is required. The goal is to find mechanisms and genes that will be conserved in the three species and therefore will be most likely also conserved in human embryos, which are difficult to study directly (due to the difficulties to obtain human embryo samples). Our research strategy provides a reliable alternative to learn more about human developmental hematopoiesis.

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED] Based on these data generated in previous in vivo and in vitro studies, available literature and interactions with other scientists, we therefore identified potent interesting intrinsic and extrinsic regulators of HSC production [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

[REDACTED] In this project, we now wish to test their functional role on chicken, mouse and zebrafish hematopoiesis (licence required only for the two last animal models). We will test their precise mechanism of action in vivo in wild type, genetically modified (GM) animals or animals in which a specific gene or type of (stem) cell has been modified with a compound. Animals will be injected with compounds (e.g. Tamoxifen) to increase or inhibit a gene. In case a line with the required genetic modification is not available we will generate new animal lines via standard oocyte injection, blastocyst injection (mouse), or via the CRISPR/Cas9 system (see Appendix 3.4.4.1 (mouse)). We will only use well-established reagents and protocols to induce expression or deletion of the candidate gene(s). Our considerations and findings that support the use of mice and zebrafish will be part of our application that we submit to the IvD.

We will set up pilot studies with the minimum amount of animals possible to test the validity of our hypothesis (HSC regulator or not) in vivo. For that, we will collect tissues at the time when the gene candidate(s) or cell type should have the greatest effect. Each experiment is very carefully designed with clear go-no-go decisions to reduce the amount of cumulative discomfort and/or the number of animals. For every each experiment, the best trade-off will be made.

We will perform the following experiments for:

**Sub-goal 1** (see Appendix 3.4.4.3). To identify the anatomical site at the origin of hemogenic endothelial cells (or precursors), we will perform in utero transplantation of donor cells isolated from yolk sac, allantois and embryo proper (potent sites of origin). The donor cells will carry a marker (e.g.

---

fluorescent, as GFP-positive cells transplanted in wild type recipients) that will allow the traceability of these cells and their progeny after transplantation. The fluorescent donor cells will also be easily distinguishable from the wild type recipients. Donor cells will be injected in the heart of mouse recipient embryos developing in the mother uterus. We will analyse *ex vivo* the tissues and cells collected from the growing recipients (cellular, molecular and histological analysis) to determine the long-term multi-lineage hematopoietic contribution of the donor cells. Only the tissues that will contain hemogenic endothelial cells or precursors will be able to produce HSCs in the recipient embryo and to provide long-term multi-lineage hematopoietic reconstitution in the growing recipients to adult age (see below the overall summary of the procedure). These experiments will determine which tissue/microenvironment (yolk sac, allantois or embryo proper) is at the origin of hemogenic endothelial cells, which produce later on HSCs.



**Sub-goal 2.** To identify the genes involved in the regulation of HSC production and to prove their functionality, we will modify candidate genes to test their function in HSC production in mice and zebrafish. During gene modification, a fluorescent marker (e.g. GFP) will be introduced to mark the genetically modified cells. After gene modification (see [Appendix 3.4.4.1](#)), tissues and cells will be isolated and analyzed *ex vivo* (See [Appendix 3.4.4.2](#)). Donor cells will also be used to perform *in vivo* transplantation assay (transplantation of WT or modified cells in adult or neonate recipients) (see [Appendix 3.4.4.3 and 3.4.4.4](#)). HSCs are identified in an *in vivo* assay where cells are transplanted intravenously in adult recipient mice. Pre-HSCs are too immature to engraft adult recipients but they are identified in an *in vivo* assay where cells are transplanted in the liver of neonates, which constitutes a more permissive environment than the adult bone marrow. Recipients (adults and neonates) are irradiated prior transplantation to clear out the bone marrow and liver from all proliferating cells and therefore to make space. It allows the engraftment of the injected donor cells. The hematopoietic tissues and cells of the transplanted recipients will then be analyzed *ex vivo* for donor (fluorescent) contribution (see [Appendix 3.4.4.3 and 3.4.4.4](#)). The presence of donor cells in all hematopoietic lineages and all hematopoietic tissues of the recipient at long-term will prove the presence of pre-HSCs or HSCs (see below the overall summaries of the procedures).





We will also generate genetically modified zebrafish but since no hampered phenotypes are expected, this activity does not require a CCD license. After gene modification, the zebrafish will be analyzed *in vivo* by live confocal imaging of the embryo (e.g. by imaging cell emergence, maturation, survival, proliferation and/or differentiation) and by *ex vivo* analysis of the hematopoietic embryonic/adult tissues. The observation of HSC or hematopoietic defect in the hematopoietic organs/cells of the animals where

---

gene modifications have been performed will indicate that these specific genes are important HSC regulators.

**Sub-goal 3.** The sub-goal 3 is to identify new markers to better identify, isolate and locate HSC precursors (pre-HSCs), HSCs and the cells in the surrounding microenvironment that constitute the supportive niche. For this purpose, cells will be sorted based on the expression of the potent new surface markers and transplanted in neonate (assay to identify pre-HSCs; see [Appendix 3.4.4.3](#)) and adult mice (assay to identify HSCs; see [Appendix 3.4.4.3](#)), and adult zebrafish (assay to identify HSCs; see [Appendix 3.4.4.4](#)). Hematopoietic tissues will also be collected during embryonic development and adult to locate and trace the cells based on the expression of the new markers. Pre-HSCs and HSCs must localise in the clusters in the aorta, and should be thereafter be present in the successive hematopoietic organs (placenta, yolk sac, liver and bone marrow). Cells from the supportive niche should be located close by to the pre-HSCs and HSCs (e.g. in the mesenchyme underneath the clusters in the aorta of the embryo). The correct localisation and function of the cells based on the expression of the new markers will indicate that these markers are reliable markers of pre-HSCs, HSCs or supporting cells from the microenvironment.

---

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.

---

The specific protocols that we apply to achieve our research goals are outlined below, in the flowchart and Appendix. All these animal procedures and their components are currently already on going in our lab.

#### **Generation, welfare assessment and breeding of wild type and genetically modified mice (Appendix 3.4.4.1)**

To study the function or behavior of a gene or a cell type relevant for HSC production, we will use appropriate mouse lines that are either already available or that need to be generated. New mouse line(s) will be generated via standard oocyte injection, blastocyst injection, or via the CRISPR/Cas9 system. The CRISPR/Cas9 system will especially be used as highly efficient tool for simultaneously multi-gene editing. This prevents the generation and breeding of multiple homozygotes from individually targeted ES cells (Reduction of the 3Rs).

In contrast to conventional gene-targeting strategy, the use of the Cre/LoxP recombination system in conjunction with gene targeting allows us to study the consequence of gene manipulation in a cell type specific manner. By incorporating Cre recombinase recognition sites (LoxP) into the genome, Cre expression from a specific promoter can drive gene disruption, activation or tracing in a cell type specific manner. New transgenic lines and/or KO lines generated via classical methods and/or novel combinations and used for breeding of these aforementioned lines will be monitored for 2 generations to determine the absence or presence of constitutional discomfort.

Cre recombinase expression can also be activated in an inducible manner by the addition of tamoxifen. To this end the Cre is flanked by 2 mutated estrogen receptors (Creert2, or merCremer) and will only allow for Cre activation when tamoxifen is administered.

#### **Collection of tissues and cells from wild type and genetically modified animals for ex vivo analysis and collection of donor cells for transplantations (Appendix 3.4.4.2)**

To study aspects of hemogenic endothelial cells or precursors origin, pre-HSC and HSC emergence and production as well as HSC progeny, we will isolate whole embryos, and hematopoietic tissues during embryonic development and in adults (from wild type or genetically modified mice and zebrafish). *Ex vivo* analysis will be performed on isolated tissues and cells. Donor cells will also be isolated to perform transplantations (see Appendix 3.4.4.3)

#### **Transplantation in recipients (pregnant females (embryos), newborns and adult mice) and ex vivo analysis (Appendix 3.4.4.3).**

To determine the anatomical origin of hemogenic endothelium, cells isolated from the embryo proper, allantois and yolk sac will be tested by performing *in utero* transplantations in embryos in pregnant mice. To test pre-HSCs and HSCs (wild-type and mutant), transplantation will be performed in neonates and adults, respectively.

Transplanted embryos and neonates will be analysed when they reach the adult stage. Adult mice will be analysed up to 4 months post-transplantation. Tissues and cells will be collected for *ex vivo* analysis (e.g. long-term multi-lineage hematopoietic reconstitution of donor origin).

---

#### **Transplantation in zebrafish, live imaging and ex vivo analysis (Appendix 3.4.4.4).**

Genetically modified and wild type animals will be analysed for HSC production. For this purpose, the zebrafish will be subjected to transplantation, *in vivo* analysis (live time-lapse confocal imaging) and *ex vivo* analysis (histology, DNA/RNA analysis...).

#### **Generation, welfare assessment and breeding of wild type and genetically modified zebrafish**

Overall, we will generate genetically modified zebrafish but since no hampered phenotypes are expected, this activity does not require a CCD license.

(see <https://www.centralecommissiedierproeven.nl/actueel/nieuws/16/10/13/handreiking-genetisch-gewijzigde-dieren> ; genereren, fokken, genotypen, monitoren en huisvesten van genetisch gewijzigde dieren).

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.

See also Flow Chart in attachment.

All experiments are based on the preliminary identification of candidate genes or cell types. The identified genes or cell types will initially be carefully tested in tissues from embryo samples and in *in vitro* experiments. If the identified genes or cell types show an interesting expression pattern or phenotype, we will consider the extensive and careful analysis of (compound) GMO for our *in vivo* experiments. If the desired genotype is not available, we will create them ourselves. We will only use well-established reagents and protocols to induce expression or deletion of the candidate gene/s in mice (Appendix 3.4.4.1) and zebrafish.

Our three sub-goals are of equivalent importance. Therefore, our strategy is to conduct experiments to try to answer all sub-goals in parallel (and not sequentially).

To address the role of candidate genes or cell types on hemogenic endothelium, pre-HSC and HSC production in the mouse model, *in vivo* transplantation will be performed in embryos, newborns and adult, respectively (Appendix 3.4.4.3). *Ex vivo* analysis on collected cells and tissues will be done to analyse the role of candidate genes or hematopoietic cells on the hematopoietic contribution.

In some cases we will use our animal lines without any intervention for the collection of tissues or cells for *ex vivo* analysis.

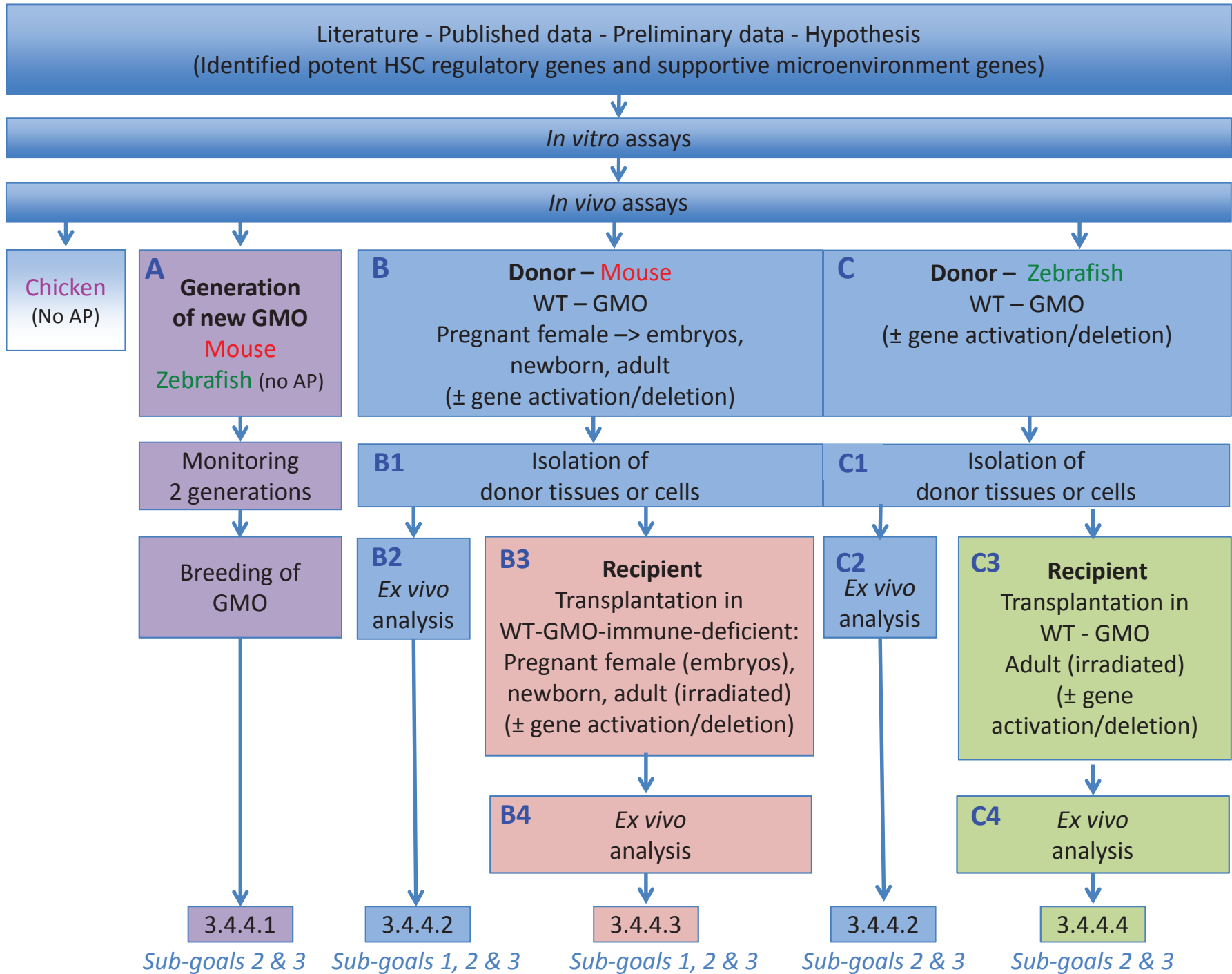
To address the role of candidate genes or cell types on HSC production in the zebrafish model, *in vivo* transplantation will be performed in adult (Appendix 3.4.4.4). Time-lapse live confocal imaging and *ex vivo* analysis on whole zebrafish and collected cells/tissues will be done to analyse the role of candidate genes or hematopoietic cells on the hematopoietic contribution, respectively.

Whenever possible, for all the *in vivo* experiments, we will perform pilot studies with the minimum amount of animals possible. It means that we will perform one experiment and will wait for the read-out result before to perform a complete set of experiments (e.g. we will wait for the result of the pilot experiment before to do the n=3 experiments requested to validate an analysis). We designed the experiments very carefully, to reduce the amount of cumulative discomfort and/or the number of animals. For each experiment, the best trade-off will be made.

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	Generation of new GMO (mice)
2	Donor – <i>Ex vivo</i> analysis (mice, zebrafish)
3	Recipient – <i>Ex vivo</i> analysis (Transplantation in pregnant females, newborns and adult mice)
4	Transplantation in zebrafish, live imaging and <i>ex vivo</i> analysis (embryo till adult)
5	
6	

7	
8	
9	
10	



3.4.4.1  
Sub-goals 2 & 3

3.4.4.2  
Sub-goals 1, 2 & 3

3.4.4.3  
Sub-goals 1, 2 & 3

3.4.4.2  
Sub-goals 2 & 3

3.4.4.4  
Sub-goals 2 & 3

## The cellular and molecular basis of the hematopoietic production

## Overview number of animals and Animal Procedures

Procedure	Title	Species	Stage	Mild	Moderate
3.4.4.1	Generation of new GMO (mice)	Mouse	Adult		3000
3.4.4.2	<i>Donor – Ex vivo analysis (mice and zebrafish)</i>				
3.4.4.2a	Pregnant females for embryos	Mouse	Adult	2205	
3.4.4.2b	Newborns	Mouse	Newborn	720	
3.4.4.2c	Adults	Mouse	Adult	126	
				3051	
3.4.4.3	<i>Recipient – Ex vivo analysis</i>				
3.4.4.3a	Pregnant females for embryo transplants	Mouse	Adult		240
3.4.4.3b	Resulting embryos	Mouse	Adult	1440	
3.4.4.3c	Transplants in newborns	Mouse	Newborn	2268	
3.4.4.3d	Transplants in adults	Mouse	Adult	2016	
				5724	
3.4.4.4	Transplantation in zebrafish, live imaging and ex vivo analysis	Zebrafish	Adult	4992	

## Total:

12.015 mice of which 3240 will have maximally moderate discomfort (27%) and 8775 with mild discomfort (73%)

4992 zebrafish with maximally mild discomfort = 100%



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	80100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	[REDACTED]	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		3.4.4.1	Generation of new GMO (mice)

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The general design of the experiments in this appendix is shown in the attached flowchart (A).

Generation of new mouse lines in general by injecting DNA/RNA into oocyte, injection of genetically modified ES cells into blastocysts and/or via the CRISPR/Cas9 system. The CRISPR/Cas9 system will especially be used as a highly efficient tool for simultaneously multi-gene editing. We will do zygote injections with Cas9 and sgRNA to create a genetic deletion or zygote injection with Cas9, sgRNA and DNA template to create knock in mice.

Welfare assessment according to the Consensus documents on genetically altered animals. New compound mouse models and new created transgenic lines and/or KO lines generated via classical methods and/or novel combinations of these aforementioned lines will be monitored for 2 generations to determine the absence or presence of a phenotype with constitutional discomfort. We will daily check the mice on several parameters like overall appearance, size, growth, coat conditions, behaviour and clinical signs.

For some transplantation experiments, immune-deficient or wild type mice are required as recipients. We breed our own wild type, immune-deficient, transgenic and knock out mouse lines. In some mouse lines we make use of the Cre/Loxp recombination system. For that we had to cross transgenic or knock out mouse lines, who are caring LoxP site in their genome, with a Cre or tamoxifen inducible Cre mouse line. We have 4-8 breeding pairs per mouse line that will be retain for a maximum of 6 months. The offspring will be used for experiments. Since our immune-deficient mice are housed under proper barrier conditions, they do not have a hampered phenotype.

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

#### *Generation of new lines*

1. Superovulation: Administration of gonadotropin's (2 times) in female mice by subcutaneous or intra-peritoneal injections followed by mating. Females will be killed for the isolation of early embryos.
2. Embryo recipients: Recipients for embryo transfer will be rendered pseudo-pregnant by mating with a sterile (vasectomized) male. Genetically modified embryos will be implanted surgically or non-surgically into the reproductive tract. Embryo recipients, not as part of an experiment, will be killed after weaning of the pups at three weeks of age.
3. Weaned pups at 3 weeks of age: Tissue sampling for genotyping and/or identification via tail or ear cut, respectively, under anesthesia (in general with isoflurane).

#### *Welfare assessment*

We will daily check the mice on several parameters (overall appearance, size, growth, coat conditions, behaviour, clinical signs, relative size and numbers) as has been described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 Jan. 2013.

#### *Breeding wild type, immune-deficient, transgenic and knock out mouse lines*

Mice will be housed under normal conditions with free access to food and water. Start breeding with a minimum of 8 weeks old mice. Breeding will be retaining for a maximum of 6 months. Depending on the amount of experimental animals, 4-8 breeding pairs per genotype will be needed.

#### *Killing animals*

In case of discomfort or surplus, animals will be euthanized by O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> method or by isoflurane and confirmed by cervical dislocation.

---

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

Statistical analysis does not play a role for these types of experiments. We will use state of art techniques. All techniques are proven to be effective in generating genetic modified mice with a minimum number of mice possible.

## **B. The animals**

---

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

#### *Animal*

Mus musculus; Wild type, GMO

Genetic background: C57Bl6

Age: embryo, newborn, adult

Origin: All vasectomized males, which will be obtained from a registered commercial company, all other mice are obtained from our own Institute, an establishment licensed breeder by the NVWA, or from a registered commercial company.

#### *Generation of genetically modified mice*

We expect to generate a maximum of 20 new mouse lines over the next 5 years (corresponding to the 20 candidate HSC regulatory genes identified, see Proposal). For the creation of new mouse line, we will use on average max 150 mice (according to the 'besluit biotechnologie'). Therefore, a total of max:

→ 150 (mice) x 20 (mouse lines) = **3000 mice** is requested.

*Welfare assessment*: a maximum number of 5120 mice will be used for welfare assessment (not part of the license project).

**We do not expect hampered phenotype in our new GM lines.** All new lines will be monitored for a hampered phenotype and the outcome of the monitoring will be reported to the IvD. We intend no breeding with mice showing a hampered phenotype. If we observe mice with a hampered phenotype during the monitoring phase, we will sacrifice these animals immediately.

The offspring of these breeding pairs will be used in appendix 3.4.4.2 and 3.4.4.3.

---



### 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.

Before considering the generation of a new (compound) GM mouse line, we will first extensively analyse data from previous studies [REDACTED] to determine whether our research hypothesis is valid. Only if the embryo/tissue analysis and/or in vitro experiments are insufficient to completely address the research question/hypothesis, we will consider the generation of a novel GM mouse line.

We make extensive use of in vitro experiments where possible, which extensively reduces the animal numbers. The use of in vitro cultures/assays allows this project to comply with the 3Rs (replacement, reduction and refinement) by keeping the mice numbers to be used to a minimum. Indeed, our in vitro data, consisting of flow cytometry analysis and in situ hybridization experiments, have permitted to tremendously reduce our long list of potent HSC regulators to 20 (see Preliminary data in part 3.1)). Based on these data, available literature and interactions with other scientists, we will now study the functional role of these genes during endothelial specialization, endothelial into hematopoietic transition, pre-HSC maturation, HSC survival and/or expansion or involved in the supportive surrounding microenvironment. The functionality of these gene scan only be performed in vivo (in transplantation assays).

Animal studies are unavoidable if we seek comprehensive knowledge and understanding of molecular and cellular mechanisms of HSC production.

The CRISPR/Cas9 system allows us, if required, to genetically modify up to 5 different genes at the same time. This strongly reduce the number of mice used for the generation and/or breeding of these compound mice.

Since we are dealing with complex systems where all different cell types contribute to the outcome, it is not possible to appropriately study HSC biology without using animals.

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects; all mice will be housed under strict D1 conditions.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

The experiments in this project are not carried out due to legal requirements.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

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

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

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

If required, adequate anesthesia and analgesia will be used.

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

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

We do not expect to find other adverse effect. This is the direct result of how we create our constructs for the generation of GM mice

Explain why these effects may emerge.

n.a.

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

Daily monitoring of the mice combined with an experimental design aiming at reducing the discomfort of the animals.

### **J. Humane endpoints**

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

No > Continue with question K.

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

Weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behavior or body posture, and signs of general sickness and/or discomfort.

Indicate the likely incidence.

We do not expect a hampered phenotype.

### **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').

3,000 mice, Moderate 100%; caused by the induction of superovulation and mating with a relative large male.

The true discomfort will be assessed for each individual experiment.

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals are killed when no longer needed anymore (surplus or fosters) or for analysis (to collect cells or tissues for *ex vivo* analysis, the animals will then be used under Animal Procedure 3.4.4.2.

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	80100 - KNAW	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	[REDACTED]	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 3.4.4.2	Type of animal procedure Donor – Ex vivo analysis (mice, zebrafish)

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The general design of the experiments in this appendix is shown in the attached flowchart (B).

To identify, localize and test hemogenic endothelial cells or precursors, HSC precursors (pre-HSCs) and HSCs, these cells will be isolated from WT or GMO. Cells and tissues will be collected from embryos, neonates and adults and tested in ex vivo assays and in transplantations (Flowchart B [mouse] and C [zebrafish]).

##### \* Animal models (mouse, zebrafish)

There are several considerations to choose for a specific animal type:

- WT. They will be used to provide WT tissues or cells for ex vivo analysis (control) and to provide donor cells for transplantation experiments (see Appendix 3.4.4.3 [mouse] and 3.4.4.4 [zebrafish]).

- GMO will be used to provide donor tissues or cells for ex vivo analysis and to provide donor cells for transplantation experiments (see Appendix 3.4.4.3 [mouse] and 3.4.4.4 [zebrafish]).

GMO will be used to study the HSC function of a specific gene or type of (stem) cell. Several transgenic or mutant strains will be used. They are needed for several reasons: (1) the presence of a genetic marker is needed to trace the cells and their progenitors after transplantation; (2) to study a specific marker; (3) to study the influence of a gene (known to be important for hematopoiesis) upon the biology of (stem) cells.

In some cases, transgene inducing or deleting agents (e.g. tamoxifen) are administered to induce the expression of the fluorescent marker in a specific cell type/lineage or to change the expression of the functional gene (transgene knockout). The hematopoietic tissues and cells of the GMO will be collected (see Flowchart B1 and C1) and analysed ex vivo (see Flowchart B2 and C2). We will also use endogenous

and exogenous promoters that are tissue or cell specific to drive expression of genes. The presence of e.g. a fluorescent marker in a (putative) stem cell allows us to localize these cells by confocal imaging. The introduction of e.g. a toxin receptor (e.g., Diphtheria toxin receptor) in the cells allows us to specifically kill these cells upon the administration of the toxin (e.g. Diphtheria toxin). It allows us to determine the consequence of the loss of the toxin receptor expressing cells during development and for tissue homeostasis.

If a required GMO is not available, we will obtain this model by generating, importing or by crossing existing models (see Appendix 3.4.4.1).

The choice of animals will in all cases be based on the combination of the following considerations:

- Aim/ specific question (e.g. Identification of pre-HSCs, of HSCs, of hemogenic endothelial cells or precursors, of a cell type specific expression of a fluorescent marker for an immune-histochemical study)
- Aim/readout parameters (e.g. ex vivo assay)

**\* Interventions:**

- Donor cells and tissues will be collected from embryos, neonates and adults (see Flowchart B and C).
- With the administration of small molecule compounds/drugs/chemicals/toxins, we might be able to rescue or mimic the phenotypes of the in vivo genetic deletion(s) and/or activation(s) and therefore further identify the function of these cells. The animals might be injected with DNA labelling agents shortly before euthanasia to measure the proliferation capacity of the stem cells and their derivatives ex vivo.

**\* Readout parameters /endpoint:**

- To study the molecular and/or cellular mechanisms of HSC production, we need to analyse tissues and cells ex vivo. Cells and hematopoietic tissues will be collected from embryos, newborns and adults (WT and GMO).

---

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

- Animals are ordered from a commercial NVMA licensed breeder or from a registered commercial company, or are generated by us under appendix 3.4.4.1.
- Animals will be used as donor of tissues/cells for ex vivo studies or as donor for subsequent transplantations

**\* Mouse model:**

- Donor pregnant females used to collect donor tissues/cells from embryos (see Flowchart B and B1). Pregnant female will be used to generate the donor embryos. The pregnant females will be euthanized by CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> followed by CO<sub>2</sub> inhalation. After disinfection of the fur with 70% ethanol, a two-sided incision will be made in the fur and skin in the abdominal area. Using sterile forceps, the uterus will be pulled out and place in a culture dish-containing medium. The embryos and extra-embryonic tissues (allantois and yolk sac) will be isolated. Embryos from different ages (E8, E9, E10, E11, E12, E14 and E18) will be used to test the presence of pre-HSCs and HSCs in intra- and extra-embryonic tissues.

- Newborns and adult mice used as donors (see Flowchart B and B1)  
Newborns and adult mice will be used to collect hematopoietic cells and tissues to test the presence of pre-HSCs and HSCs.

In some cases, we will perform the administration:

- transgene inducing or deleting agents or control substances, alone or in combination, continuously or intermittently by one or more of the following routes:
  - a) in diet or drinking water (maximally 1 time, < 2 wks)
  - b) subcutaneous (in general 2 times but maximally 3 times)
  - c) intraperitoneal (in general 4 times but maximally 7 times)
  - d) implantation of a slow release pellet subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia (maximally 1 time)
  - e) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia (maximally 1 time)
  - f) oral (in general 5 times but maximally 10 times)

- small molecule compounds, drugs, toxin, chemicals or control substances, alone or in combination, continuously or intermittently by one or more of the following routes:

- a) in diet or drinking water (maximally 1 time, < 2 wks)
- b) subcutaneous (in general 5 times but maximally 10 times)
- c) intraperitoneal (in general 5 times but maximally 10 times)
- d) implantation of a slow release pellet subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (maximally 1 time)
- e) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (maximally 1 time)
- f) oral (in general 5 times but maximally 10 times)

- labeling agent (e.g. BrdU) via one of the following routes:

- a) intraperitoneal (maximally 1 time but maximally 3 times)
- b) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (maximally 1 time)
- c) intravenous (maximally 1 time)

*None of the presented administration procedures will result in higher than cumulative mild discomfort.*

Readout parameters /endpoint (see Flowchart B2)

The pregnant females will be kept under observation until delivery of the newborns. After birth and short weaning of the newborns (< 5 days), the mother will be euthanized by CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> followed by CO<sub>2</sub> inhalation. Embryos and neonates (< 5 days) will be put on melting ice water for 10 min (but not in contact with) after which they will be decapitated and the head immediately frozen. The adult mice are sacrificed by CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> followed by CO<sub>2</sub> inhalation or via cervical dislocation. Embryos and embryonic tissues (yolk sac, allantois), and neonate and adult tissues (e.g. blood, bone marrow, spleen, thymus, lymph nodes) will be collected for ex vivo analysis (e.g. in situ hybridization, flow cytometry analysis, molecular biological analysis (PCR), histological analysis to look at aspects of cell size, survival, proliferation and differentiation).

\* Zebrafish model:

All donor tissues and cells will be collected before 5 dpf and, therefore, these zebrafish are not part of the license.

---

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

The animal numbers are mainly based on our preliminary experience. We know that the analysis of the requested number of animal per experiment guarantees us a proper analysis of these animals. We have tried to reduce the number of animals per experiments to a minimum. Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a  $p < 0.05$ .

Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based in literature and/or years of experience with similar type of experiments. Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of animals per group that will be informative. The very low number of cells available from early embryonic tissues (embryo proper, allantois or yolk sac) implicates the use of a higher number of embryos and therefore of pregnant female mice. All mice will be euthanized to collect the embryonic tissues and therefore will only be used once. The number of pregnant female mice (carrying donor embryos) needed has also been calculated according to the average number of embryos per litter (6 embryos/litter), to the number of embryos needed to test the different tissues at different embryonic stages, and the number of cells that will be available for analyses.

---

## **B. The animals**

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

---

All animals will be used to provide tissues/cells for ex vivo analysis and to provide donor cells for transplantation experiments (see Appendix 3.4.4.3 [mouse] and 3.4.4.4 [zebrafish]). To note, the number of experiments needed is based on your experience over the last years and my expectation that my workgroup has a rather stable number of experienced researchers involved.

### **1- Mus musculus, (WT, GMO)**

Genetic background: C57Bl6

Age; embryos, newborns, adults

Origin: Mice are obtained from our own Institute or from external licensed breeders.

**Number of animals (Total in 3.4.4.2): max. 3051**

For the majority of the proposed studies, the mouse (beside the zebrafish) is one of the most appropriate animal model to use because: (1) like humans, mice are mammals; (2) physiology is more extensively characterized; (3) mice are amenable to transgenic modification; (4) a large number of relevant transgenic and knock out lines are already available.

#### - Donor pregnant females used to collect donor tissues/cells from embryos and neonates

Donor pregnant females are needed:

(i) to generate embryo, yolk sac and allantois.

Based on our previous experience, there is an average of 6 embryos/litter.

Seven embryonic stages (E8, E9, E10, E11, E12, E14 and E18) will be tested because they correspond to a specific time points of hematopoietic (stem) cell specification, emergence, maturation, colonization and expansion. Pluggings will be performed with wild type and GMO. The experiments will be performed three times for each assay to be scientifically reliable.

The cell populations of putative precursors in the embryo proper, allantois and yolk sac are very small at early time points of development. Thus, many embryos will be needed to be able to perform *ex vivo* analysis. Moreover, only up to 50% of the pups in the litters will carry a donor marker (e.g. fluorescent marker) and thus an average of 3 pups will be used per litter, with 5 litters needed per experiment (for a total of 3 experiments). The mothers will be killed for each experiment.

Therefore we need:

→ 7 (embryonic stages) x 5 (females/experiments) x 21 (1 WT and 20 GMO) x 3 (experiments) = **2205 mice.**

#### - Newborns used to collect donor tissues/cells

To determine the presence of Pre-HSCs in any given sample (Boisset *et al.* Blood, 2015), an average of 12 newborns will be used per experiments.

Therefore we need:

→ 120 (pregnant females – see above) x 6 (neonates) = **720 newborns.**

#### - Adults used to collect donor tissues/cells

Different hematopoietic tissues will be collected from WT and GMO for ex vivo analysis. An average of two mice will be needed per experiment to collect enough cells and tissues. The experiments will be performed three times for each assay to be scientifically reliable.

Therefore we need:

→ 2 (mice) x 21 (1 WT and 20 GMO) x 3 (experiments) = **126 mice.**

### **2- Zebrafish (WT, GMO):**

All donor tissues and cells will be collected before 5dpf and therefore these zebrafish are not part of the license.

---

### **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.

Animal studies are unavoidable if we seek for the fundamental insight into the molecular and cellular mechanisms that drive HSC production and regulation.

We make extensive use of *in vitro* experiments where possible, which extensively reduces the animal numbers. The use of *in vitro* cultures/assays allows this project to comply with the 3Rs (replacement, reduction and refinement) by keeping the mice numbers to be used to a minimum. Indeed, our *in vitro* data, consisting of flow cytometry analysis and *in situ* hybridization experiments, have permitted to tremendously reduce our long list of potent HSC regulators to 20 (see Preliminary data in part 3.1)). Based on these data, available literature and interactions with other scientists, we will now study the functional role of these genes during endothelial specialization, endothelial into hematopoietic transition, pre-HSC maturation, HSC survival and/or expansion or involved in the supportive surrounding microenvironment. The functionality of these gene scan only be performed in vivo (in transplantation assays).

Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible.

Where possible, mice with inducible alleles will be used, so mice should not display a phenotype before the induction of the alleles.

Experiments will be done sequential, where on basis of the results, decisions will be made on the next steps.

If homozygous mice do not show any discomfort, we will keep the mice on a homozygous background, thereby reducing the number of mice.

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects.

### **Repetition and duplication**

#### **E. Repetition**

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

The experiments in this project are not carried out due to legal requirements.

### **Accommodation and care**

#### **F. Accommodation and care**

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.



Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

- Anaesthesia will be administered (by inhalation) to mice in case of blood collection (in general: Isofluraan (4%)).

- Analgesia will be administered to mice in case of pain (in general: Rimadyl)

- Parameters for health monitoring: Mice will be kept as groups. Food and drinking water will be provided ad libitum. Animals will be monitored for health status (welzijnsdagboek) by the animal caretakers. Animals with a decreased health status (such as weight loss, bristly fur, bent back) will be checked by the researcher as well. In case of 15% loss of body weight within 2 days, the mice will be euthanized. In case of 20% loss of body weight compared to the littermates, the mice will be euthanized.

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

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

Other than in terminally anaesthetized animals dosing and sampling procedures will be undertaken using a combination of volumes, routes and frequencies that will result in no more than transient, mild discomfort. In less than 3% of all experiments, pumps/pellets will be implanted which leads to a moderate discomfort.

Due to administration of inducing agents or other substances, animals will be experiencing no follow up effects.

The scientific endpoints of all studies are much earlier than the humane endpoints.

It is not expected that the activation or inactivation of genes will lead to discomfort. However, it is impossible to predict the nature or severity of any potential genetic defect. So, in all cases, animals will be carefully monitored for possible side effects. Animals exhibiting any unexpected harmful phenotypes will be killed within a day and analysed.

Explain why these effects may emerge.

Mice might have sickness and/or disorientation signs after waking up from anesthesia (after blood collection) and have some pain due to the surgery. Analgesia will be administered accordingly.

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

Monitoring of the animal combined with an experimental design aiming at reducing the discomfort of the animals. If we unexpectedly observed weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behavior or body posture, signs of general sickness and/or discomfort animals will be taken out of experiment and sacrificed.

### 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.

Weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behaviour or body posture, and signs of general sickness and/or discomfort.

Indicate the likely incidence.

Expected <5%, mild <1day.

### **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').

Pregnant females; n = 2205; Mild

Newborns; n = 720; Mild

Adult mice; n = 126; Mild

Total = 2331 adult mice and 720 newborns

- Waking up from anaesthesia (after blood collection): Mice might have sickness and/or disorientation signs. Mild, < 1 day, expected 100%.

- Sacrifice: Mild, < 10 minutes, 100% animals

## **End of experiment**

### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The animals need to be killed to collect embryos, cells or tissues for *ex vivo* analysis and to provide donor cells for transplantation experiments.

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	80100 - KNAW	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	[REDACTED]	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.  <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	3.4.4.3	Recipient – <i>Ex vivo</i> analysis (Transplantation in pregnant females, newborns and adult mice)

#### 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.

The general design of the experiments in this appendix is shown in the attached flowchart (B3 and B4).

To identify and test hemogenic endothelial cells or precursors, HSC precursors (pre-HSCs) and HSCs isolated from WT or GMO (see Appendix 3.4.4.2), we need to perform in vivo transplantation assays in embryos in pregnant females (1), newborns (2) and adults (3), respectively (Flowchart B3). The different ages of the recipients provide different permissive microenvironment and allow the engraftment of various cell types (from the embryo to adult age). Hematopoietic tissues and cells of all transplanted recipients (embryos, neonates, adults) will be analysed ex vivo at 4 months post-transplantation (Flowchart B4).

(1) To determine the anatomical origin of hemogenic endothelial cells or precursors, cells (isolated from donor embryos, see Appendix 3.4.4.2) will be tested by performing transplantations in embryo recipients directly in pregnant recipient females (E7-E10). The recipient embryos will be analysed when they reach the adult stage for long-term donor multi-lineage hematopoietic reconstitution.

(2) To identify pre-HSCs, isolated candidate donor cells (see Appendix 3.4.4.2) are transplanted in newborns or immuno-deficient recipient mice (a more permissive environment for immature cells).

(3) To identify HSCs, isolated candidate donor cells (see Appendix 3.4.4.2) are transplanted in adult recipient mice.

In all cases, the primary recipients are analysed up to 4 months post-transplantation (to prove the multi-lineage property of the donor cells). Secondary transplantations are performed to prove the self-renewal property of donor cells. These secondary recipients are also analysed 4 months post-transplantation.

### **\* Mouse model**

There are several considerations to choose for a specific mouse model. WT and GMO mice will be used as recipients.

- WT and GMO:

GMO will be used to study the HSC function of a specific gene or type of (stem) cell. Several transgenic or mutant mouse strains will be used. They are needed for several reasons: (1) the presence of a genetic marker is needed to trace the cells and their progenitors after transplantation; (2) to study a specific marker; (3) to study the influence of a gene (known to be important for hematopoiesis) upon the biology of (stem) cells.

In some cases, transgene inducing or deleting agents (e.g. tamoxifen) are administered to induce the expression of the fluorescent marker in a specific cell type/lineage or to change the expression of the functional gene (transgene knockout). We will also use endogenous and exogenous promoters that are tissue or cell specific to drive expression of genes. The presence of e.g. a fluorescent marker in a (putative) stem cell allows us to localize these cells by confocal imaging. The introduction of e.g. a toxin receptor (e.g., Diphtheria toxin receptor) in the cells allows us to specifically kill these cells upon the administration of the toxin (e.g. Diphtheria toxin). It allows us to determine the consequence of the loss of the toxin receptor expressing cells during development and for tissue homeostasis.

To identify/validate for example which molecular and cellular processes are important for HSC production and regulation, we will analyse GMO in which cells/tissues are transplanted and the gene(s) will be activated, inactivated, overexpressed and/or misexpressed. These mice will be used as recipients (see Flowchart B3). We will use inducible systems including e.g. the well-known Cre-LoxP system in which a floxed gene can be deleted, overexpressed or misexpressed upon the induction of the Cre enzyme via the administration of tamoxifen. In particular, when Cre is expressed in mice harbouring a LoxP-containing target gene, the desired gene modification can be restricted to certain developmental stage, organ, cell type (e.g. stem cell) of the mouse depending on the specificity and timing of recombinase expression. In this way the desired gene modification can be restricted to certain developmental stage, organ, cell type (e.g. stem cell). Successful deletion/activation via (e.g.) Cre enzyme induction might be monitored via expression of a reporter gene (e.g. LacZ or fluorescent protein(s)).

If a required genetically modified mouse is not available, we will obtain this model by generating, importing or by crossing existing models (see Appendix 3.4.4.1). WT recipients serve as control.

- Immune-deficient or newborn recipients. Immune-deficient mice are required in some cases as recipients since they are more permissive to the engraftment of very immature cells.

The choice will in all cases be based on the combination of the following considerations:

- Aim/ specific question (e.g. Identification of pre-HSCs, of HSCs, of hemogenic endothelial cells or precursors, of a cell type specific expression of a fluorescent marker for an immune-histochemical study)
- Aim/readout parameters (e.g. to test long-term hematopoietic repopulation)

### **\* Interventions:**

- Cells will be transplanted intra-cardiac in embryo recipients, intra-liver in newborn recipients and intravenously in adult recipients (see Flowchart B3). Newborns and adult recipients will be irradiated. The irradiation is performed to clear out the bone marrow and liver from all proliferating cells and therefore to make space. It allows the engraftment of the injected donor cells.

- To identify/validate for example which molecular and cellular processes are important for HSC production and regulation, we will analyze wild type mice or GMO (in which functional gene(s) will be activated, inactivated, overexpressed and/or misexpressed) after transplantation. The presence of e.g. a fluorescent marker in transplanted cells allows us to visualize these cells and their progeny.

- With the administration of small molecule compounds/drugs/chemicals/toxins, we might be able to rescue or mimic the phenotypes of the *in vivo* genetic deletion(s) and/or activation(s) and therefore further identify the function of these cells *in vivo*. The mice might be injected with DNA labeling agents shortly before euthanasia to measure the proliferation capacity of the stem cells and their derivatives.

### **\* Readout parameters /endpoint:**

To study the molecular and/or cellular mechanisms of HSC production, we need to analyze tissues and cells *ex vivo*. Cells and hematopoietic tissues will be collected from up to 4 months after transplantation (see Flowchart B4).

In some cases, we will need to collect cells with a certain genetic constitution to transplant back into wild type or GMO (secondary transplantation).

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

Mice are ordered from a commercial NVMA licensed breeder or from a registered commercial company, or are generated by us under appendix 3.4.4.1.

- Recipient pregnant females used for the in-uterus transplantation in E7-E10 embryos (see Flowchart B3)

Pregnant females will be used to generate recipient embryos (immune-deficient or wild type). Between E7 to E10 post-coitus, the pregnant females will be anaesthetized in a knock down box and then maintained by facemask with 2-3% Isoflurane. Hairs will be removed on the abdomen using a depilatory cream and then the abdomen will be rinsed with water. The female will be positioned on a platform ventral side up. Eye lubricant will be placed on each eye to prevent drying. A small amount of ECG gel will be placed on the copper leads on the platforms and the paws taped on them. This will provide the ECG and respiratory physiology of the mouse. A rectal probe will be inserted to monitor the temperature of the animal during the imaging session and will be maintained at 35-38°C using a heating pad and a lamp. The stage upon which the mouse is placed is tilted head down (between 35–45°) to displace the bowel. Maternal well-being will be carefully monitored to maintain an appropriate body temperature, heart rate, respiratory vigour, and anaesthetic depth throughout the procedure. After sterilizing the skin with 70% ethanol, the abdomen will be opened with a 2 cm vertical midline incision along the linea alba (midline avascular region). A short segment of the uterine horns containing 1-3 embryos will be gently exteriorized from the abdominal cavity by using sterile forceps. With an injection needle, a small hole will be made in the uterus. Through this hole, the cells will be injected into the heart cavity of the embryo by using a glass transfer needle in combination with a micro-injector (guided by a high resolution ultrasound apparatus). This will allow the injection of very small volumes of cells (50 nL) while causing little damage to the tissue. The embryo is positioned in such a way that the heart is visible with the high-resolution ultrasound detector. Special care will be made for the tissues through which the needle will pass through before hitting the target of interest (the heart), especially by avoiding passing through the placenta (that might compromised the embryo development or generate bleeding). All embryos from the litter will be injected. After injection, the uterus will be guided back into the abdomen, muscle layer will be stitched and the skin will be closed with staples by using a wound clamp. The whole procedure will take about 20-30 minutes. To prevent cooling down of the recovery mouse, the cage will be put on a heating plate.

- Newborns and adult mice used as recipients (see Flowchart B3)

Transplantation of cells will be performed under adequate anaesthesia and analgesia.

→ Transplantation in newborns

\* Wild-type or immuno-deficient newborns (1 to 5 days old) will be used. WT newborns will be treated to compromise their hematopoietic/immune system (by irradiation of the newborns [using a gamma-source] or by busulfan treatment of the pregnant females [to compromise the hematopoietic/immune system of the litter while still inside the uterus of the mother]). For irradiation, neonates will receive a single dose of 5 Gy. During irradiation, mice will be kept as a group in a cage without anaesthesia.

\* Donor cells are injected in the livers of the newborns (max. 0.05 ml).

\* Mice will receive antibiotics (such as neomycin) in the drinking water for the first 3 months post transplantation. The animal being irradiated, they are more subject to bacterial infections (until their immune system is restored. The antibiotics will prevent such possible infection.

→ Transplantation in adults (primary and secondary transplantation)

\* Adult wild-type mice (>8 weeks) will be treated to eliminate their hematopoietic/immune system by irradiation using a gamma-source or 5-FU treatment. For irradiation, adults will receive a sub-lethal dose as a split dose (4 and 5 Gy with 3 hours in between). During irradiation, mice will be kept as a group in a cage without anaesthesia.

\* Donor cells are injected intravenously (max. 0.2 ml) in the tail vein.

\* Mice will receive antibiotics (such as neomycin) in the drinking water for the first 3 months

post transplantation to prevent bacterial infections.

Cells of reconstituted recipients will serve as donor cells for secondary transplantations (to test the self-renewal of the cells, second specific feature of a HSC). The adult secondary recipients will receive a sub-lethal dose of irradiation as a split dose (4 and 5 Gy with 3 hours in between), as described above.

All transplanted animals will be kept under observation and analysed at adult stage when they are older than 8 weeks old (see Flowchart B4).

**Summary of the transplantation procedures:**

<b>Assay</b>	<b>To test/To identify</b>	<b>Donor cells</b> <i>(see Appendix 3.4.4.2)</i>	<b>Recipient</b>
In uterus transplantation	Hemogenic endothelial cells (or precursors)	E8 embryo, yolk sac, allantois	Embryo (E7-E10)
Newborn transplantation	Pre-HSCs	Embryonic tissues (E8-E10)	Newborn (P1-P5)
Adult transplantation	HSCs	Embryonic tissues (E10-E12, E14 and E18)	Adult mice (> 8 weeks)

In some cases, we will perform the administration of:

- transgene inducing or deleting agents or control substances, alone or in combination, continuously or intermittently by one or more of the following routes:

- a) in diet or drinking water (maximally 1 time, < 2 wks)
- b) subcutaneous (in general 2 times but maximally 3 times)
- c) intraperitoneal (in general 4 times but maximally 7 times)
- d) implantation of a slow release pellet subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia (maximally 1 time)
- e) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia (maximally 1 time)
- f) oral (5 times but maximally 10 times)

- small molecule compounds, drugs, toxin, chemicals or control substances, alone or in combination, continuously or intermittently by one or more of the following routes:

- a) in diet or drinking water (maximally 1 time,, <2 wks)
- b) subcutaneous (in general 5 times but maximally 10 time)
- c) intraperitoneal (in general 5 times but maximally 10 times)
- d) implantation of a slow release pellet subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (maximally 1 time)
- e) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia (maximally 1 time)
- f) oral (in general 5 times but maximally 10 times)

- labeling agent (e.g. BrdU) via one of the following routes:

- a) intraperitoneal (in general 1 time maximally 1 times)
- b) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (maximally 1 time)
- c) intravenous (maximally 1 time)

None of the presented administration procedures will result in higher than cumulative mild discomfort.

**Readout parameters /endpoint (see Flowchart B4)**

After transplantation, the recipient animals will be kept under observation. In the case of transplantation in embryos, the pregnant females will be kept under observation until delivery of the pups. The pups will be checked at birth for viability. Pups will be kept (males and females separated) and analyzed at adult stage.

Blood (maximum volume at the different time points: 300 µl) will be collected at 1 or 2 time points: 1-2

months and/or 4-6 months post transplantation to determine the donor cell contribution in the peripheral blood. At the end of the experiment (4-6 months post transplantation), all mice are sacrificed by CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> followed by CO<sub>2</sub> inhalation or via cervical dislocation, and tissues/cells are collected for ex vivo analysis. The long-term multi-lineage hematopoietic reconstitution will be tested by flow cytometry analysis or by molecular biological analysis (PCR on GFP). For this, cells or DNA will be isolated from the different adult mouse hematopoietic tissues (blood, bone marrow, spleen, thymus, lymph nodes). Tissue will be collected for histological and molecular analysis to look at aspects of cell size, survival, proliferation and differentiation. In some cases, cells will be collected to perform secondary transplantations. Embryos and newborns (< 5 days) will be put on melting ice water for 10 min. (but not in contact with) after which they will be decapitated and the head immediately frozen. After birth and weaning of the pups (that are used as embryo recipients), the mother will be euthanized by CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> followed by CO<sub>2</sub> inhalation. For post-surgery pain relief, when anaesthetised, a s.c. dose of Rimadyl will be given in general. One injection will be made once pre-operatively and repeated once 24 hours after surgery. We have expertise in all the surgical procedure steps needed for the experiments.

The cumulative discomfort in the genetic models will maximally consist of discomfort due to:

- the genetic modification (< 5% of lines)
- transplantation of cells under adequate anaesthesia and analgesia
- sacrifice

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

The mice numbers are mainly based on our preliminary experience. We know that the analysis of the requested number of mice per experiment guarantees us a proper analysis of these mice. We have tried to reduce the number of animals per experiments to a minimum. Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a  $p < 0.05$ .

Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based in literature and/or years of experience with similar type of experiments. Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative. The very low number of cells available from E8 tissues (embryo proper, allantois and yolk sac) implicates the use of a higher number of embryos and therefore of pregnant females. All mice will be euthanized to collect the embryonic tissues and therefore will only be used once. The number of pregnant females (carrying recipient embryos) needed has also been calculated according to the average number of embryos per litter (6 embryos/litter), to the number of embryos needed to test the different tissues at E8, and the number of cells that will be available for analyses (very low at E8).

## **B. The animals**

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

Mus musculus, (WT, genetically modified, mutants, immuno-deficient mice)

Genetic background: C57Bl6

Age; embryos, newborns, adults

Origin: Mice are obtained from our own Institute or from external licensed breeders.

### **Number of animals (Total): max. 5964**

Up to today, there are no alternative methods than in vivo transplantation to fully study HSC production and regulation in the context of the whole organism. For the majority of the proposed studies, the mouse is one of the most appropriate animal model because: (1) like humans, mice are mammals; (2) physiology is more extensively characterized; (3) mice are amenable to transgenic modification; (4) a large number of relevant transgenic and knock out lines are already available.

To note, the number of experiments needed is based on your experience over the last years and my

expectation that my workgroup has a rather stable number of experienced researchers involved.

### **A) In utero transplantation in embryos in pregnant females**

#### - Pregnant females used to generate E7-E10 recipient embryos

The recipient females give an average litter size of 6. We need a minimum of 12 pups (2 litters) injected for a valid and reliable conclusion. Pups will be injected with 3 different cell populations from E8 allantois, yolk sac and embryo proper (= 3 kind of tissues). All embryos from the litter will be injected by the same cell type (since embryos cannot be marked at that stage to be discriminated at birth). The pregnant mice will be injected at E7, E8, E9 and E10 because the stage that will provide the best engraftment is unknown yet. Because the intra-cardiac injection in embryos is difficult, we know by experience that an average of 10 experiments are needed per tissue tested to achieve a reliable (and therefore publishable) data.

Therefore we need:

→ 4 (embryonic stages) x 2 (females/experiments) x 3 (kind of tissues) x 10<sup>#</sup> (experiments) = **240 transplanted pregnant mice.**

# Intra-cardiac injection in developing embryos is very difficult to achieve. Sometimes (i) the needle misses the heart and cells are not injected properly, (ii) the embryo does not survive to the procedure or (iii) there is a blockage in the needle and all cells cannot be injected. For these reasons, we estimated that 10 experiments are needed for a reliable conclusion (in comparison to all other experiments [that are technically easier and 100% successful in our hands] where 3 experiments are needed for statistical analysis).

#### - Growing transplanted embryo recipients (that will be analysed at adult age)

The amount of transplanted embryo recipients to analyse for long-term multi-lineage reconstitution at adult age is:

→ 240 (transplanted pregnant females – see above) x 6 (embryos/litter) = **1440 adults transplanted when at embryonal stage.**

### **B) Transplantation in newborns (pre-HSC assay)**

#### - Newborn recipients for transplantation:

To determine the presence of Pre-HSCs in any given sample, we need to do transplantations in newborn recipients (Boisset *et al.* Blood, 2015).

We need a minimum of 12 newborns injected for a valid and reliable conclusion. Newborns will be injected with cells isolated at 3 different time points (E8, E9 and E10; 3 time points when pre-HSCs are detectable; isolated under AP 3.4.4.2). The experiments will be performed three times for each assay to be scientifically reliable with WT and GMO lines.

Therefore we need:

→ 3 (embryonic stages) x 12 (newborns) x 21 (1 WT and 20 GMO) x 3 (experiments) = **2268 newborn recipients.**

### **C) Transplantation in adults (HSC assay)**

#### - Adult recipients for transplantation:

To determine the presence of HSCs in any given sample, we need to do transplantations in adult recipients (Harrison *et al.* Experimental Hematology, 1993; Szilvassy *et al.* PNAS, 1990). Adults will be injected with donor cells isolated at 5 different time points (E10, E11, E12, E14 and E18; 5 time points when HSCs are detectable in different tissues; isolated under AP 3.4.4.2). Based on literature and our own experience we estimate the variation per group at 15% (= anticipated coefficient of variation). The difference that we need to be able to detect is 15% (= difference considered meaningful). To get a power of 0.8 with the aforementioned percentages, we will need a group size of 18 animals in total (Van Zutphen *et al.*, Principles of laboratory animal science). For secondary transplantations (a requirement for the self-renewal feature of a HSC), we use 6 recipients in total (standard in the field).

Therefore we need:

→ 5 (embryonic stages) x 18 (6 mice x 3 experiments) x 21 (1 WT and 20 GMO) = **1890 adult**



**recipients** (1<sup>st</sup> Tx)

→ 6 (2 mice x 3 experiments) x 21 (1 WT and 20 GMO) = **126 adult recipients** (2<sup>nd</sup> Tx)

### 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.

Animal studies are unavoidable if we seek for the fundamental insight into the molecular and cellular mechanisms that drive HSC production and regulation.

We make extensive use of *in vitro* experiments where possible, which extensively reduces the animal numbers. The use of *in vitro* cultures/assays allows this project to comply with the 3Rs (replacement, reduction and refinement) by keeping the mice numbers to be used to a minimum. Indeed, our *in vitro* data, consisting of flow cytometry analysis and *in situ* hybridization experiments, have permitted to tremendously reduce our long list of potent HSC regulators to 20 (see Preliminary data in part 3.1)). Based on these data, available literature and interactions with other scientists, we will now study the functional role of these genes during endothelial specialization, endothelial into hematopoietic transition, pre-HSC maturation, HSC survival and/or expansion or involved in the supportive surrounding microenvironment. The functionality of these gene scan only be performed *in vivo* (in transplantation assays).

Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible.

Where possible, mice with inducible alleles will be used, so mice should not display a phenotype before the induction of the alleles.

Experiments will be done sequential, where on basis of the results, decisions will be made on the next steps.

If homozygous mice do not show any discomfort, we will keep the mice on a homozygous background, thereby reducing the number of mice.

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

The experiments in this project are not carried out due to legal requirements.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

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

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

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

- Anaesthesia will be administered (by inhalation) in case of:  
\* blood collection (at 1 and/or 4 months post transplantation) – Isofluraan (4%), in general.  
\* to the pregnant females during all the intra-uterus transplantation procedure – Isofluraan (2-3%) , in general.

- Analgesia will be administered in case of pain (such as Rimadyl) to:  
\* the transplanted mice  
\* the pregnant females. One injection will be made once pre-operatively and repeated once 24 hours after surgery. The pregnant females will be checked regularly (until delivery) after in utero cell transplantation and also on the delivery day (and the following week). Pups should develop normally. If abnormality or discomfort is visible, the pups will be sacrificed by CO2/O2 followed by CO2 inhalation. Animals will be sacrificed (and tissues collected) if unexpected illness occurs (by CO2/O2 followed by CO2 inhalation).

- Parameters for health monitoring: Mice will be kept as groups. Food and antibiotic drinking water (such as neomycin) will be provided ad libitum. Animals will be monitored for health status (welzijnsdagboek) by the animal caretakers. Animals with a decreased health status (such as weight loss, bristly fur, bent back) will be checked by the researcher as well. In case of 15% loss of body weight within 2 days, the mice will be euthanized. In case of 20% loss of body weight compared to the littermates, the mice will be euthanized.

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

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

Other than in terminally anaesthetized animals dosing and sampling procedures will be undertaken using a combination of volumes, routes and frequencies that will result in no more than transient, light mild discomfort. In less than 3% of all experiments, pumps/pellets will be implanted which leads to a mild discomfort.

Due to administration of inducing agents or other substances, animals will be experiencing no follow up effects.

The scientific endpoints of all studies are much earlier than the humane endpoints.

It is not expected that the activation or inactivation of genes will lead to discomfort. However, it is impossible to predict the nature or severity of any potential genetic defect. So, in all cases, animals will be carefully monitored for possible side effects. Animals exhibiting any unexpected harmful phenotypes will be killed within a day and analysed.

Explain why these effects may emerge.

Mice might have sickness and/or disorientation signs after waking up from anesthesia and have some pain due to the surgery. Analgesia will be administered accordingly.

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

Monitoring of the mice combined with an experimental design aiming at reducing the discomfort of the animals. If we unexpectedly observed weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behavior or body posture, signs of general sickness and/or discomfort animals will be taken out of experiment and sacrificed.

#### **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.

Weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behaviour or body posture, and signs of general sickness and/or discomfort.

Indicate the likely incidence.

Expected <5%, moderate <1day.

#### **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').

Recipient pregnant females; n = 240 mice; Moderate

Growing transplanted embryo recipients; n = 1440 mice; Mild

Newborn recipients; n = 2268 mice; Mild

Adult primary recipients; n = 1890 mice; Mild

Adult secondary recipients; n = 126 mice; Mild

Total = 5964 mice

- After irradiation: The animals might develop a decreased health status during the first month (loss of weight). Mild, 7-30 days, expected <10%.
- After transplantation in adult: Mice might be more sensitive to infections. Mild, 7-30 days, expected <10% (because of antibiotics in the drinking water).
- After in utero transplantation (because of the surgery): Moderate, 1 day, 100% animals
- Waking up from anaesthesia (after in utero transplantation, blood collection): Mice might have sickness and/or disorientation signs. Mild, < 1 day, expected 100%.
- Sacrifice: Mild, < 1 minute, 100% animals

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The animals need to be killed to collect embryos, cells or tissues and for ex vivo analysis.

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

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

---

Yes

---



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 80100 - KNAW
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. [REDACTED]
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure   |
|---------------|--|
| 3.4.4.4       | Transplantation in Zebrafish, live imaging and ex vivo analysis. |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Wild type or genetically modified zebrafish will be used to study HSC production and regulation during embryonic development and in adult.

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

The zebrafish (as the mouse) is now firmly established as a reliable developmental and genetic model to study vertebrate hematopoiesis. To enable the study of HSC production and regulation in zebrafish, we will perform HSC manipulation into embryos (e.g. tamoxifen injection) and/or transplantation in adult recipient animals (hematopoietic mutant or wild type conditioned by gamma-irradiation (as described in Traver *et al.* Blood. 2004; Henninger *et al.* Nat. Cell Biol. 2016) (see Flowchart C3). HSC transplantation will allow to study cell autonomy of mutant gene function and to rescue multi-lineage hematopoiesis in embryonic lethal mutants. Transplant recipients are anesthetized in tricaine (in general) and injected intra-cardiac by using glass capillary needles.

The transplanted adult animals (>3 months old) are visualized weekly under an inverted fluorescent microscope to monitor donor fluorescent cells over the first 30 days after transplantation. In some cases (analyze the function of specific genes), fish treated between 48-72 hours post fertilization with a tamoxifen injection will be grown to 5 months. They will be then subjected to split dose 30Gy irradiation and transplanted. This high dose of irradiation is provided to eliminate the hematopoietic cells of the fish recipient, which is necessary to allow the engraftment of the donor cells. The irradiation dose has been chosen based on the literature published by various laboratories

performing transplantation experiments in zebrafish.

At a chosen end point (depending of the research question, between 6 to 20 weeks post irradiation/transplantation), the animals will be anesthetized (in general) with 0.02% tricaine prior to collect the hematopoietic tissues for *ex vivo* analysis (e.g. histology, *in situ* hybridization, RNA/DNA isolation) (see Flowchart C4). Different *ex vivo* analysis techniques require different handling of the extracted tissue (e.g. cryo-sectioning or paraffin embedding). If possible the *ex vivo* techniques will be combined.

Some zebrafish embryo will also be used for time-lapse live confocal imaging. In our experience the imaging method described in (Renaud *et al.* (2011), Nature Protocols) is the most reliable method. Direct visualization of fluorescent donor cells in embryonic recipients allows engraftment and homing events to be imaged in real time. These results provide a cellular context in which to study the genetics of hematopoiesis. During imaging, embryos are anaesthetized (in general) with 0.02% tricaine in embryo buffer. The imaging will be done once for each zebrafish embryo for up to 24h (age of embryos: below 5 days post fertilization (dpf) and, therefore, are no part of the licence project).

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

- It is our experience (in our institute and in the literature) that in general 16 (transplanted) adult animals are needed to collect tissues/cells (Flow chart C4) and 30 embryos for live confocal imaging per condition. These numbers are based on common scientific practice in our research field to allow publication.
- Different *ex vivo* analysis techniques require different handling of the extracted tissue (e.g. cryo-sectioning or paraffin embedding). To reduce the number of animals that are required we will combine *ex vivo* assays for different parameters as much as possible.

## **B. The animals**

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

### **Maximum of zebrafish: 4,992**

To note, the number of experiments needed is based on your experience over the last years and my expectation that my workgroup has a rather stable number of experienced researchers involved.

- Zebrafish (*Danio rerio*) is one of the most well characterized fish. Zebrafish are well maintained and bred in a laboratory condition. Furthermore, the zebrafish model comes with numerous tools, which can be used to fully exploit its potential, including a fully annotated genome and efficient genome editing strategies.

- The zebrafish used here are bred in [REDACTED]

- To test HSC engraftment or to test the effect of a treatment or genetic condition on HSC production a maximum of 16 animals (8 controls and 8 treated) are required for each type of analysis. To test HSC engraftment, the animals will be analysed at 1 time point (adult). To test the effect of a treatment or genetic condition, it will be required to analyse up to 3 time points (time point of HSC emergence in the embryo aorta, time point of HSC colonization/expansion in the embryo CHT, time point of colonization of adult hematopoietic organs). In all cases, we will measure up to 4 different *ex vivo* parameters (e.g. gene expression, lineage tracing, cell proliferation, cell apoptosis,) requiring different fixation and embedding techniques (See Flowchart C4).

Experiments will be performed on embryos and adults. However, experiments on zebrafish < 5 dpf is not considered as an animal experiment. Therefore, only the experiments on adult animals are part of the license and only these animals are counted. Therefore, we will use:

16 animals (8 controls and 8 treated) x 1 time point (adult) x 4 (*ex vivo* parameters) x 3 (experiments)  
= **192 fish**

It is expected that during the duration of this project we will test 25 genetically modified or knockout lines. Tissues and cells will be collected on all animals. Therefore we will use:

16 animals (8 controls and 8 treated) x 1 time point (adult) x 4 (*ex vivo* parameters) x 25 (genetically modified or knockout lines) x 3 (experiments) = **4800 fish**

- Live confocal imaging will be performed on embryos (<5dpf and therefore no part of license project). It is our experience that 30 embryos per condition are needed to analyse EHT and HSC production. This embryo number is common scientific practice in the research field to achieve reliable and publishable results.

### 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.

- Replacement: HSC production needs to be studied *in vivo*. There are no *in vitro* models available to study HSC production. Zebrafish are easy to maintain in an animal facility and are a well-characterized model to study HSC production.
- Reduction: *Ex vivo* assays will be combined as much as possible to reduce the number of animals that are required. The experiments will be executed in a phased order so that follow up experiments are only executed when pilot experiments show a positive outcome.
- Refinement: Animals will be anaesthetized in general in Tricaine solution to reduce the discomfort of the treatment.

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

In order to minimize the animal suffering, all procedures to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects. Procedures will only be performed by competent personnel.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

The proposed procedures are for fundamental research. It does not consist of legally required research.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

The animals will be anaesthetized during transplantation with proper anaesthesia (in general with MS222 - Tricaine methanesulfonate, 0.02%). We do not expect stress and discomfort in animals during transplantation.

Anesthesia will also be performed (in general with 0.02% tricaine) before blood (obtained by cardiac puncture), kidney and spleen collection.

Transplanted recipients will be anesthetized in general in tricaine and immobilised in individual conical wells made in 2% agarose. Cells will be injected into the sinus venosus of the embryo at 48-72hpf or in adults. Recipients will be maintained in medium containing penicillin and streptomycin during and for several hours after transplantation to prevent infection.

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

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

No other adverse effects on the animals' welfare are expected.

Explain why these effects may emerge.

n.a.

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

### 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.

The animals will be checked daily for signs of general sickness and discomfort (e.g. laying on the bottom of the tank, rapid gill movements).

Indicate the likely incidence.

Expected in <1%; mild discomfort no longer than 1 day (due to the irradiation and transplantation).

### 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').

n = 4,992 zebrafish; Mild

Animals reaching the humane end-point will be euthanized.

**End of experiment**



**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Transplanted zebrafish will be killed to collect hematopoietic tissues/cells for ex vivo analysis.

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.

Zebrafish will be killed by submersion in ice-cold water for at least 10 minutes. This procedure is currently common practice and is part of the guidelines by the Animal Research Advisory Committee (ARAC) of the NIH.

Yes

# Format DEC-advies

---

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

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

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: [AVD80100 2017 1047](#)
2. Titel van het project: [The cellular and molecular basis of the hematopoietic production](#)
3. Titel van de NTS: [De cellulaire en moleculaire basis van de vorming van bloedvormende stamcellen](#)
4. Type aanvraag:
  - [nieuwe aanvraag projectvergunning](#)
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: [KNAW](#)
  - telefoonnummer contactpersoon: [020 5664427](#)
  - e-mailadres contactpersoon: [DECsecr@knaw.nl](mailto:DECsecr@knaw.nl)
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: [12-04-2017](#)
  - aanvraag compleet: [28-04-2017](#)
  - in vergadering besproken: [20-04-2017](#)
  - anderszins behandeld: [niet van toepassing](#)
  - termijnonderbreking(en) van [21-04-2017](#) tot [28-04-2017](#)
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: [niet van toepassing](#)
  - aanpassing aanvraag: [finale herziene versie ontvangen op 28-04-2017](#)
  - advies aan CCD: [17-05-2017](#)
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.  
[De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat de aanvraag de instemming heeft van de IvD.](#)

*Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrond informatie etc) kan bij punten 8 en 9 worden volstaan met de vermelding van het type vragen en de vermelding dat de aanvraag op de desbetreffende onderdelen is aangepast of dat de antwoorden in de aanvraag zijn verwerkt. Bij vragen die gericht zijn op het verkrijgen van verklaringen voor keuzes die door de aanvrager gemaakt worden, kan niet worden volstaan met het weergeven van de strekking van de antwoorden tenzij de antwoorden volledig in de aanvraag zijn opgenomen. Als dat het geval is, moet dat in het DEC advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.*

8. Eventueel horen van aanvrager:

- Datum: 20-04-2017
- Plaats: ██████████
- Aantal aanwezige DEC-leden: 7
- Aanwezige (namens) aanvrager: de hoofdaanvrager
- Gestelde vraag / vragen: de mondeling gestelde vragen zijn later tevens schriftelijk aan de aanvrager gestuurd en hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag
- Verstrek(e) antwoord(en): zie onder vraag 9  
Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: wel; zie onder vraag 9

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 21-04-2017; n.a.v. de bespreking van de eerste versie van de aanvraag
- Gestelde vraag/vragen: De vragen zijn gericht op het verkrijgen van aanvullende informatie ter completering van de aanvraag.

**Proposal**

- *The section on preliminary data is somewhat difficult to understand; perhaps some of the more technical terms could be deleted or replaced by a somewhat more simplified description?*
- *In the background section a summary on the state-of-affairs within the international field on HSC research is lacking. What are other people working on and why is your approach unique?*
- *There are 3 sub goals; the DEC advises to make clear in 3.4.3 of the Proposal what the strategy will be. Will you first address subgoal 1, followed by subgoal 2 etc. Or will you follow a more parallel strategy?*
- *Concerning 3.3, the Relevance of the project. It seems to the DEC that the long-term perspective is somewhat wider than stated. Would the outcome of the project not also allow the use of induced pluripotent stem cells; this would avoid the procedure of harvesting stem cells from donors or from embryo's. The DEC challenges you to sketch the wider long-term potential relevance of the project but keeping in mind that it should be a realistic perspective.*
- *The DEC understands that a list of interesting candidates has been generated (proposal page 4). The DEC would like to understand the reasoning to reach the decision to actually start studies on a particular target. Assuming the list includes several hundreds of genes; which one to select? Could you make the entry criteria more clear?*
- *As discussed after the presentation; the figure in your presentation donor > transplantation > read out seems to be quite helpful to understand your strategy (Proposal 3.4.1). We suggest including this scheme/figure in the application.*
- *The arguments to use three different species is that you want to identify conserved mechanisms since these are more likely represent the mechanisms also relevant for the human situation. This seems a valid reason but in your presentation you also mentioned that for publication most journals also require the use of multiple species. In addition, you also pointed out that the three species are used in a complementary manner; certain techniques are most suited for a particular species. As explained by you: chicken for tissue grafting, mice for TG studies and the zebrafish for longitudinal studies. The DEC wants you to incorporate these arguments in the application. Also address whether or not you will start out to address a specific question in all three species at the same time or whether you will select one of the species and later on include the other species for validation.*
- *The DEC advises to discuss the use of human embryos as a possible alternative in the 3R's. You made clear that this material is difficult to get, that only a few of your studies could be performed and that there are ethical issues involved. The conclusion would be that this is not a reasonable alternative for the proposed animal experiments.*
- *In the Proposal 3.4.1. it is stated that "for every experiment, we design the experiment with a clear go-no-go decisions ...." However, this is not substantiated in the application. This could be included in 3.4.1 or under the description of the strategy coherence (Section 3.4.3).*
- *A similar issue is noted with the statement in Proposal 3.4.1. "we will set up pilot studies..." . Again this is not substantiated and section 3.4.3 is most suited to explain this.*
- *Related to the above; under the three R's (section D) it is stated that "the use of in vitro cultures allows this project to ...." However, in the application this is not explained. The DEC assumes that the outcome of preliminary in vitro experiments may be one of the factors on which it is decided to start in vivo experiments or to start generating one of the 20 new TG*

*mouse lines. Section 3.4.1 seems the best place to explain the involvement/role of the in vitro experiments.*

**Animal Procedures:**

- *In your presentation the motivation to use irradiation was "to clear out the bone marrow". Please make this clear in the application. The impression was raised that the irradiation was to generate an animal deprived of an immune system to prevent host versus graft responses.*
  - *It is state that no hampered phenotypes (mice or fish) are expected. However, given the role of the HSCs, it seems more logical that a dysfunctional HSC system would result in a hampered phenotype. On which facts or consideration do you think that it is justified to make such a statement and the decision to not include breeding animals with hampered phenotype?*
  
  - Gezien de aard van de vragen en de mondeling gegeven toelichting op vragen van de DEC tijdens de bespreking is de DEC van mening dat de aanvrager naar alle waarschijnlijkheid een afdoend antwoord zal kunnen geven en dan een discussie van de herziene versie van het project in een plenaire DEC bijeenkomst niet nodig is.
  
  - Datum antwoord: 28-04-2017; de aanvrager heeft de aanvraag herzien en separaat gereageerd op de vragen en opmerkingen van de DEC. De herziene finale versie is via een schriftelijke ronde door de DEC leden positief beoordeeld.
  - Verstrekt(e) antwoord(en): De aanvrager heeft de aanvraag gecomplementeerd en de gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd in de finale versie.
  
  - De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: **wel**
10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): **niet van toepassing**
- Aard expertise
  - Deskundigheid expert
  - Datum verzoek
  - Strekking van het verzoek
  - Datum expert advies
  - Advies expert

## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.  
*Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.*  
**Het project is vergunningplichtig.**
  
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag / een wijziging op een bestaande vergunning.  
**Nieuwe aanvraag – Zie A4**
  
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?  
**Ja**
  
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.  
**Er zijn geen DEC-leden uitgesloten van de behandeling en het opstellen van het advies.**

## C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).  
Deze aanvraag heeft een concrete en duidelijke hoofddoelstelling, te weten: het identificeren van de moleculaire en cellulaire mechanismen betrokken bij ontstaan van bloedvormende stamcellen en de regulatie van deze mechanismen tijdens de embryonale ontwikkeling van zebrafish, muis en kip. Deze hoofddoelstelling zal worden bereikt door het verrichten van studies naar de anatomische plaats van het ontstaan van de allereerste stamcellen (subdoel 1), wat de functionele rol is van een aantal genen waarvan, op basis van vooronderzoek, vermoed wordt dat die een rol spelen in het ontstaan van de stamcellen (subdoel 2) en het identificeren van nieuwe markers om de stamcellen en cellen betrokken bij de stamcelproductie beter te kunnen identificeren, isoleren en lokaliseren (subdoel 3).

De strategie om de drie subdoelen is duidelijk uitgewerkt. In de geplande uitvoering van het project zullen de experimenten gericht op het behalen van de subdoelen geen directe onderlinge relatie of tijdsafhankelijkheid hebben, de doelstelling zal binnen de looptijd van 5 jaar kunnen worden gehaald, de subdoelen zijn uitgewerkt en duidelijk, elk subdoel levert een bijdrage aan het hoofddoel. De DEC komt tot de conclusie dat de aanvraag overeen komt met voorbeeld 4B van de handreiking 'Invulling definitie project'. De aanvraag heeft naar de mening van de DEC voldoende samenhang en is te typeren als een project.

Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.

Gezien het bovenstaande komt de DEC tot de conclusie dat de aanvraag voldoende samenhang heeft en daarmee toetsbaar is.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).  
Dit valt buiten de taakstelling van de DEC als beschreven in artikel 18a.2.b van de Wod. Naar deze specifieke informatie wordt in het aanvraagformulier en de bijbehorende toelichting niet gevraagd en de aanvrager heeft deze informatie dan ook niet verstrekt. Het is voor de DEC daarom niet mogelijk om op dit punt een onderbouwde uitspraak te doen. De DEC wil erop wijzen dat mocht dit in sommige omstandigheden wel het geval zijn dat de CCD in een procedure voorziet waarin de aanvrager inzage krijgt en verweer kan voeren.
3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.  
De doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling.

### **Belangen en waarden**

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap*

1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld).

Het *directe doel* van het project is het identificeren van de moleculaire en cellulaire mechanismen betrokken bij ontstaan van bloedvormende stamcellen en de regulatie van deze mechanismen tijdens de embryonale ontwikkeling van zebravis, muis en kip. Het uiteindelijke doel is om op basis van de mechanismen die in alle onderzochte diersoorten gevonden worden ("conservering") mechanismen de vorming van bloedvormende stamcellen in de mens beter te begrijpen en om met de nieuw verworven kennis de productie van patiëntgebonden bloedvormende stamcellen te kunnen opzetten. De verwachting is dat met de nieuwe kennis het genereren van bloedvormende stamcellen uit lichaamseigen geïnduceerde pluripotente stamcellen een stap dichterbij zal komen. Dit zal bijdragen aan therapieën om patiënten met afwijkingen in de bloedvorming te kunnen genezen via transplantatie van de gegenereerde cellen.

De DEC is ervan overtuigd dat het doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is, wat de bijdrage van het al verrichte werk van de onderzoeksgroep is geweest, en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld naar verwachting zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de fundamenteel wetenschappelijke kennis over de productie van bloedvormende stamcellen nog beperkt is en dat het project zal resulteren in herte vergroten van de wetenschappelijke inzichten op dit terrein.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*)  
De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: (i) *De proefdieren*. De integriteit van de dieren zal in geringe mate worden aangetast. Het merendeel van de muizen (72%) zal mild ongerief ondervinden door de proeven en een kleiner deel (28%) maximaal matig ongerief. De zebravissen zullen mild ongerief ondervinden. In het kader van de proeven zullen de dieren worden gedood. (ii) *De bij de uitvoering van het project betrokken onderzoekers*. De onderzoekers zullen een substantiële toename in kennis en vaardigheden verkrijgen. De carrièremogelijkheden van de onderzoekers zullen verbeteren door publicaties. Ook de kans op het behouden en verkrijgen van nieuwe onderzoeksmogelijkheden, veelal deels gebaseerd op een goede wetenschappelijke reputatie, zal toenemen. Deze waarden zijn naar opvatting van de DEC echter van gering gewicht in de ethische afweging. (iii) *Onderzoekers in veld van de ontwikkelingsbiologie*. Dit onderzoek is in de eerste plaats fundamenteel van aard. Het zal resulteren in een toename van de ontwikkelingsbiologische inzichten hoe bloedvormende stamcellen worden gevormd in het lichaam en welke factoren van belang zijn in de regulatie van dit proces. Indien het mogelijk wordt om stamcellen in vitro te kunnen vormen en bestuderen zal dit resulteren in een vermindering van het gebruik van proefdieren en proefdierembryo's. (iv) *De doelgroepen in de maatschappij*. De nieuwe kennis draagt bij aan inzichten hoe lichaamseigen bloedvormende stamcellen buiten het lichaam kunnen worden geproduceerd voor transplantatiedoeleinden bij patiënten met afwijkingen in bloedvormende processen (o.a. anemie- en leukemiepatiënten). Op dit moment zijn deze patiënten geheel afhankelijk van de beschikbaarheid van geschikte donoren wat maar in 30% van de gevallen mogelijk is. Op basis van de nieuw verworven kennis kan een transplantatietherapie beschikbaar worden voor een grotere groep patiënten en is het risico op complicaties kleiner.

Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

Nee

6. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en de geschikte voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende expertise heeft om gedurende het project te kunnen blijven voldoen aan de 3V's.

7. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).

De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen van het project en bij recente wetenschappelijke inzichten. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten zoals beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende fundamenteel wetenschappelijke kennis zal worden verkregen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak zal leiden tot het behalen van de doelstelling van het project. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel gezien de opbouw, de grootte van de onderzoeksgroep en de beschikbare financiële ondersteuning door ██████████. Het project sluit goed aan bij de resultaten van het vooronderzoek dat de groep heeft verricht.

Tijdens de uitvoering van het project zullen de in de aanvraag beschreven kaders, inclusief de kaders van ongerief, nauwgezet door de IvD bewaakt worden. De inzet van de vier verschillende Type Dierproeven is duidelijk en is goed onderbouwd.

De keuze voor het parallel gebruik van de muis en zebravis als proefdier, naast het gebruik van kipembryo's) is gemotiveerd: het zijn complementaire modellen met elk specifieke technische voordelen, de mogelijkheid tot het vinden van geconserveerde mechanismen.

De gegevens uit het vooronderzoek zijn verkregen in de drie soorten en biedt de continuering van het onderzoek aan dezelfde proefdiersoorten een grotere kans op het behalen van de doelstellingen en de acceptatie/publicatie van de resultaten binnen het wetenschappelijke veld.

### **Welzijn dieren**

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

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

Er is geen sprake van bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.

9. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.  
De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn.
10. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).  
De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.  
Het ongerief is door de onderzoekers ingeschat als mild ongerief voor het merendeel (72%) van de in totaal 11.700 muizen en matig ongerief voor 28% van de dieren. De muizen ondervinden maximaal matig ongerief voornamelijk door de gevolgen van een chirurgische ingreep, de gevolgen van hormooninjecties of dekking door een relatief groot mannetje. De dieren worden in het kader van of aan het einde van de proef gedood en het weefsel wordt ex vivo onderzocht. De zebnavissen (4992) zullen maximaal mild ongerief ondervinden.  
  
Gegeven de zorgvuldige beschrijving van de procedures in de verschillende bijlagen Type Dierproeven is de DEC van mening dat het beschreven ongerief en de classificatie van het cumulatieve ongerief een realistische inschatting is.
11. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).  
De integriteit van de dieren zal in geringe mate en tijdelijk worden aangetast tijdens de uitvoering van de proeven waarbij het herstel van een chirurgische ingreep, de gevolgen van een hormooninjectie op jonge leeftijd en de gedwongen paring met een relatief grote man de belangrijkste factoren zijn.
12. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).  
De humane eindpunten zijn duidelijk gedefinieerd. De DEC is het met de aanvrager eens dat de kans klein is dat de dieren ten gevolge van de procedures een humaan eindpunt zullen bereiken. De verwachting is dat er geen sprake is van een aangetast fenotype t.g.v. de genetische modificaties. Indien de genetische modificaties leiden tot een aantasting van de vorming van bloedvormende stamcellen zal dit resulteren in de dood van het dier in de embryonale fase. Indien het aantal bloedvormende stamcellen minder is dan normaal dan zullen de dieren anemisch zijn maar dit zal niet resulteren in een aantasting van hun gezondheid door de afwezigheid van fysieke uitdagingen en door de huisvesting in een schone omgeving.

### **3V's**

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



*Stap 1.C3).*

De DEC is van mening dat de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen vervangingsalternatieven zijn. Om de fundamenteel wetenschappelijke kennis te vergroten over het identificeren van de moleculaire en cellulaire mechanismen betrokken bij ontstaan van bloedvormende stamcellen en de regulatie van deze mechanismen tijdens de embryonale ontwikkeling van zebravis, muis en kip, is het noodzakelijk om proefdieren te gebruiken voor transplantatie-experimenten. De reden is dat voor de beschreven doelen de interactie tussen stamcellen en micro-omgeving een rol speelt en dat verschillende ontwikkelingsstadia zich in verschillende organen afspelen. Hiervoor bestaan geen alternatieven op basis van (stam)cellijnen of computermodellen. Waar mogelijk maken de onderzoekers gebruik van in vitro experimenten.

14. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).  
De DEC is van mening dat het maximale aantal van 11.700 muizen en 4992 zebravissen te gebruiken dieren realistisch is geraamd en proportioneel is ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. Er is sprake van een sequentiële gefaseerde aanpak om de subdoelen te behalen waarbij iedere volgende stap wordt afgewogen op basis van de verkregen resultaten. Waar mogelijk worden pilot experimenten gedaan voorafgaand aan een volledig experiment met drie herhalingen.
15. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).  
De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke heeft gedaan om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. De verwachting is dat humane eindpunten zelden zullen worden bereikt.
16. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe.

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

Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek. Alle dieren in proef worden na afloop gedood en het weefsel wordt voor ex-vivo studies gebruikt.

17. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).  
De aanvrager gebruikt waar mogelijk mannelijke en vrouwelijke dieren behalve als er zwangere dieren nodig zijn.
18. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).  
De aanvrager geeft aan dat het noodzakelijk is om dieren te doden in het kader van het

project. Het weefsel wordt voor ex-vivo studies gebruikt en de verkregen gegevens dragen bij aan het behalen van het doel. De aanvrager gebruikt voor het doden een methode die beschreven is in bijlage IV van de richtlijn en waarvoor geen aanvullende voorwaarden gelden.

Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

Niet van toepassing.

### **NTS**

19. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

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

## **D. Ethische afweging**

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).  
Rechtvaardigt het identificeren van de moleculaire en cellulaire mechanismen betrokken bij ontstaan van bloedvormende stamcellen en de regulatie van deze mechanismen tijdens de embryonale ontwikkeling van zebrafish, muis en kip het merendeels (72% voor muizen; 100% voor de zebrafishes) milde ongerief en matige ongerief (28% muizen) dat dieren wordt aangedaan in het voorliggende project?
2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden*).  
De volgende waarden/belangen zijn in het geding (zie onderdeel C5): Waarden/belangen met betrekking tot de proefdieren: de dieren ondervinden *maximaal matig ongerief* dit wordt door de DEC beschouwd als *veel nadeel*. De belangen voor de uitvoerende onderzoekers: *veel voordeel*. De belangen met betrekking tot de doelgroepen binnen het veld van de neurobiologie: de kennisvergroting wordt door de DEC gezien als *zwaarwegend en veel voordeel*. De belangen met betrekking tot de maatschappij (patiëntengroepen): op korte termijn *gering voordeel* maar op lange termijn *mogelijk veel voordeel*.
3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld*).  
De DEC is van mening dat de benoemde belangen van de wetenschap en samenleving in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. De volgende

overwegingen hebben bijgedragen tot deze conclusie:

- Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit resulteren in een aanmerkelijke toename van de ontwikkelingsbiologische inzichten hoe bloedvormende stamcellen worden gevormd en welke regulatiesystemen daarbij betrokken zijn. Deze kennis is van belang voor het opzetten van het methoden om deze stamcellen in vitro te kunnen opgroeien voor transplantatiedoeleinden. Dit zal een einde kunnen maken aan het huidige tekort aan het aantal geschikte transplantatiedonoren in het kader van behandelingen van ondermeer anemie en leukemie. De kennis hiertoe ontbreekt nog en de verwachting is dat het project een grote bijdrage zal leveren om die leemte te vullen.
- De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en recente wetenschappelijke inzichten. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.
- Het is naar de mening van de DEC aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden. Om dit doel te bereiken is het nodig proefdieren te gebruiken. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken waardoor het uiteindelijk ongerief van elk individueel dier, naar verwachting, voor een deel van de dieren beperkt blijft tot maximaal matig ongerief en mild ongerief voor de rest.
- De DEC is overtuigd van het belang van de wetenschappelijke doelstelling en het belang van de nieuwe kennis.
- De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen en, tijdens de uitvoering van het project, te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen.
- De DEC is van mening dat de aanvrager bij de uitvoering van het project alle mogelijke maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken en het aantal dieren tot een minimum te beperken.

Gezien bovenstaande overwegingen is de DEC van opvatting dat het bereiken van de doelstelling, op de wijze zoals beschreven in deze projectaanvraag, het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
  - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
  - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
  - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten: **geen**.
- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
  - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
  - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).  
[Het advies is unaniem](#)
3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).  
[De DEC heeft geen dilemma's gesignaleerd die binnen of buiten de context van het project vallen.](#)



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Kon. Ned. Academie van Wetenschappen (KNAW)

Postbus 19121

1000 GC AMSTERDAM



**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  
AVD8010020171047

**Bijlagen**

2

Datum 17 mei 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 17 mei 2017. Het gaat om uw project "The cellular and molecular basis of the hematopoietic production". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD8010020171047. 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:**

17 mei 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD8010020171047

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**  
17 mei 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD8010020171047

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 80100  
Naam instelling of organisatie: Kon. Ned. Academie van Wetenschappen (KNAW)  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 54667089  
Postbus: 19121  
Postcode en plaats: 1000 GC AMSTERDAM  
IBAN: NL47DEUT0436465302  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: KNAW

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: Groepsleider  
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:**

17 mei 2017

**Aanvraagnummer:**

DEC10020171047

**Over uw project**

Geplande startdatum:

1 juni 2017

Geplande einddatum:

1 juni 2022

Titel project:

The cellular and molecular basis of the hematopoietic production

Titel niet-technische samenvatting:

De cellulaire en moleculaire basis van de vorming van bloedvormende stamcellen

Naam DEC:

DEC-KNAW

Postadres DEC:

Meibergdreef 47 1105 BA Amsterdam

E-mailadres DEC:

decsecr@knaw.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen:

€ 1.684,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Amsterdam

Datum:

15 mei 2017





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Kon. Ned. Academie van Wetenschappen (KNAW)

Postbus 19121

1000 GC AMSTERDAM



**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  
AVD8010020171047

**Bijlagen**

2

Datum 17 mei 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 17 mei 2017

Vervaldatum: 16 juni 2017

Factuurnummer: 171047

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD8010020171047	€ 1.684,00

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.

## Response to: Vraag bij de behandeling van AVD8010020171047

*U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning gedaan. Bij de behandeling hiervan hebben wij nog een paar vragen. Het betreft uw project: 'The cellular and molecular basis of the hematopoietic production' met aanvraagnummer AVD8010020171047.*

→ All comments and questions have been answered and all changes appear in red in the revised version of the documents.

*In bijlage 3.4.4.2 moet het aantal foeten van E18 in aantal worden meegeteld als dierproef. Bij zoogdieren worden dieren vanaf het derde trimester van de dracht gezien als proefdier. U maakt de foeten dood ten behoeve van het verzamelen van organen, dit is een dierproef met licht ongerief. Wanneer het dieraantal veranderd zal de Niet Technische Samenvatting ook aangepast moeten worden.*

→ The following paragraph has been added in Appendix 3.4.4.2:

“- E18 embryos used to collect donor tissues/cells

Different hematopoietic tissues will be collected from WT and GMO E18 embryos for ex vivo analysis. An average of 6 embryos will be needed per experiment to collect enough cells and tissues. The experiments will be performed three times for each assay to be scientifically reliable.

Therefore we need:

→ 6 (E18 embryos) x 21 (1 WT and 20 GMO) x 3 (experiments) = **378 embryos.**”

The number of mice has been adjusted in the appendix 3.4.4.2 and in the “Niet Technische Samenvatting” document and in the “Overview number of animals” table.

*Worden in de bijlagen 3.4.4.3 en 3.4.4.4 beide geslachten zebra vissen en muizen ingezet?*

→ Both genders for fish and mice will be used. The following sentence has been added in section 2B of the appendix 3.4.4.2, 3.4.4.3 and 3.4.4.4:

“Genders: both males and females will be used.”

*U beschrijft dat er in het project go/no go beslismomenten zijn. De criteria hiervoor beschrijft u niet, kunt u deze beschrijven?*

→ The following paragraph is now included in the revised version of the project proposal (section 3.4 Research strategy):

“Before generating a new GMO line, the gene of interest will be studied based on the literature. The expression pattern of the gene in embryonic tissues will be carefully examined by in vitro analysis (e.g. in situ hybridization, flow cytometry analysis). When the GMO lines will be synthesized with the most promising regulator genes, their effect will be tested on HSCs by in vivo transplantation assays. One transplantation experiment will be performed and analyzed to decide if the gene is a potent interesting HSC regulator (e.g. observation of less mice reconstituted 4 months post-transplantation of GMO cells [where the gene is inactivated] compared to WT cells). Only then, more mice will be transplanted to reach n=3 independent experiments.”



## Form Project proposal

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

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

Every day, blood stem cells (also named hematopoietic stem cells or HSCs) produce billions of new blood cells, which are needed for an organism to survive. This massive cell production is possible due to two important properties inherent in HSCs, multipotency and self-renewal. The multipotency property allows single HSCs to produce all the different blood cell types (e.g. erythrocytes that carry oxygen in tissues,

platelets that provide coagulation in case of bleeding, lymphocytes that protect the organism against infections). The self-renewal property allows HSCs to produce all blood cells without exhaustion of the HSC pool, which remains constant during life. These inherent properties confer to HSCs the capacity to maintain blood homeostasis under physiological condition. HSCs play also a crucial role in the clinic. Indeed, defects in HSCs lead to blood-related disorders and various cancers (e.g. anemia, leukemia). The transplantation of healthy donor HSCs to replace the patient defective ones is an important part of the treatment and sometimes the only cure. However, less than 30% of the patients have matched donors in their family. Therefore, successful transplantation in most patients relies on finding unrelated volunteer donors with the highest compatibility (the chance of an optimal match being very low)<sup>1</sup>. Since the number of transplantations increases every year, the limitation in compatible HSCs available for transplantation procedures has become a major hurdle. More over, HSCs are very rare cells present in bone marrow, cord blood and mobilized peripheral blood (all tissues being used as source of HSCs in clinic). To circumvent the HSC shortage, research efforts have been made to expand donor HSCs *ex vivo* or to generate new sources of HSCs *in vitro* (e.g. from pluripotent stem cells or somatic cells)<sup>2</sup>. Despite some progresses, success has been limited and it remains impossible to date to produce large quantities of tailor-made HSCs. Because HSC production, as it occurs *in vivo*, is not fully understood yet, it is very difficult to mimic this process *in vitro*. To circumvent this issue, it is crucial (1) to better characterise the HSCs and their precursors, and (2) to identify the intrinsic factors (e.g. transcription factors) and extrinsic factors (e.g. growth factors provided by the surrounding microenvironment) that promote and regulate HSC fate determination, generation and expansion *in vivo*.

Adult HSCs are initially produced during embryonic development. They are first generated in the main arteries (aorta, vitelline and umbilical arteries) of the embryo<sup>3-5</sup> (**Fig. 1A**). They derive from hemogenic endothelial cells that are embedded in the arteries' wall<sup>6,7</sup> (**Fig. 1B**). The dynamic transition of an endothelial cell into a HSC has been observed in the aorta of chicken, mouse and zebrafish embryos<sup>8,9,10,11</sup>. Such finding demonstrated the conservation of the HSC production process in between species and the importance of the aorta microenvironment in supporting/regulating this important process. In arteries, HSCs are part of cell clusters<sup>12</sup> that will then colonize the fetal liver and placenta where the pool of HSCs expands before colonizing the bone marrow before birth (**Fig. 1A,B**). The important role of the endothelium in HSC production was an important fundamental discovery that paved the way to improve HSC production *in vitro*. For example, *in vitro* vascular induction was recently used to successfully reprogram human endothelial cells in HSC-like cells<sup>13</sup> and to induce mouse embryo aorta endothelial cells into HSC-like cells<sup>14</sup>. The produced cells are named HSC-like cells because it remains difficult to present to generate large quantities of fully functional HSCs that are able to engraft and to provide a long-term multilineage hematopoietic reconstitution when transplanted in adult recipients (the assay to experimentally identify HSCs). Therefore, research must continue to understand how a cell becomes a HSC, how it is regulated and how HSCs can expand without losing their stemness (**Fig. 1C**).

The **main research goal** in my lab is to better understand the production of HSCs, as it occurs *in vivo* during embryonic life. Our **sub-goal 1** is to determine the anatomical origin (intra- or extra-embryonic) of hemogenic endothelial cells (the cells producing HSCs). So far, it is uncertain because the blood is already circulating at the time of HSC detection in the embryo. Therefore, it cannot be excluded that hemogenic endothelial cells (or their precursors) emerge in one site and reach another anatomical site via the circulation or throughout tissues before to actually produce HSCs. It is an important sub-goal since the microenvironment of their site of origin determines the fate of these cells. Our **sub-goal 2** is to understand the function of specific genes in HSC production during embryonic life. HSC emergence and expansion are highly regulated processes both in time (as it occurs at specific time points of development) and space (in restricted regions of the vessels and organs) (**Fig. 1A**). However, the complex network of extrinsic and intrinsic regulatory factors involved *in vivo* in HSC production is still poorly understood. Our **sub-goal 3** is to find new markers for HSCs and cells from the supportive microenvironment to be able to precisely localise and follow the fate and behaviour of these cells during development.

The state-of-affairs on the production of HSCs *in vitro* is a worldwide concern since it remains impossible to achieve so far, despite extensive research. Understanding the process as it occurs *in vivo* is a very important research topic that several international labs are trying to achieve. However, only few labs study the embryonic development when the first HSCs are generated. Moreover, we are most likely the only lab able to perform a multi-species comparative study since we have the unique expertise, state-of-the-art technology and full access to the three most relevant animal models in the lab (i.e. chicken, mouse and zebrafish).

The use of the different animal models is needed because:

(i) They are complementary models. Indeed, each animal model allows different *ex vivo* analyses due to different technical advantages. For example, live imaging and cell tracing can only be performed in zebrafish embryos. Also, tissue grafting can only be performed with chicken embryos while HSC transplantation is used in the mouse and zebrafish models.

(ii) The use and comparison of different animal models allow finding conserved processes and mechanisms in between species. It reinforces the possibility that such processes and mechanisms also occur in human. In this project, chicken, mouse and zebrafish embryos will be used as reliable alternatives to human embryos to analyse in details the different aspects of HSC production during embryonic life.

(iii) The study of developmental hematopoiesis cannot be performed in human embryos due to the difficulty to access human embryo samples. When available, such samples are rare and often damaged because of the embryo collection procedure (i.e. from abortion). The use of human embryo is not a possible/realistic alternative for our project. The only alternative is to use animal models instead.

(iv) There is an increased request from the scientific community to provide and compare data in different animal models (e.g. for publication).

Because there is no need of licence to work on chicken embryos (no adult chicken will be used for the project), the requested licence only concerns the mouse and zebrafish models. Our three sub-goals are of equivalent importance. Therefore, our strategy is to conduct experiments in all three animal models in parallel to answer all sub-goals (and not sequentially since all models will provide, via different assays and *ex vivo* analysis, pieces of answers to the same question).



[REDACTED]

[REDACTED]



are functionally important during the successive steps of HSC production (such as endothelial cell specification into hemogenic endothelial cells, endothelial to hematopoietic transition, pre-HSC maturation, HSC survival and expansion). The goal of using and comparing different animal models (chicken, mouse, zebrafish) is to find conserved HSC regulators that will therefore most likely be involved also in human. Ultimately this knowledge should lead in the future to the production of tailor-made HSCs that are needed to treat patients who suffer from hematopoietic disorders and diseases.

**Our main goal is to identify the molecular and cellular mechanisms involved in HSC production and regulation during the embryonic development of zebrafish, mouse and chicken** (the three main and most reliable animal models used to study developmental hematopoiesis).

**Our specific research sub-goals are:**

**1- To determine the anatomical origin of hemogenic endothelial cells (or precursors).**

We wish to identify the anatomical site (yolk sac, allantois or embryo proper) at the origin of hemogenic endothelial cells (or precursors). We expect to identify within the 5 years of the project the microenvironment that determines the fate of hemogenic endothelial cells, which produce later on HSCs.

**2- To understand the function of specific genes in HSC production during embryonic life under basal conditions by looking at the effect on cell specialization, emergence, viability, maturation, proliferation and differentiation.**

We wish to identify the genes involved in the regulation of HSC production and we expect to prove their functionality within the 5 years of the project.

**3- To find new markers for HSCs and cells from the supportive microenvironment.**

We wish to identify new markers to better identify, isolate and locate HSCs and the cells in the surrounding microenvironment that constitute a supportive niche. We expect to identify new markers within the 5 years of the project.

This research will be performed in a lab, [REDACTED]

[REDACTED] The institute houses large zebrafish and mouse facilities, provides core facilities for various high-end techniques (e.g. sequencing, histology, confocal microscopy, flow cytometry), and expertise on animal models with dedicated and experienced animal caretakers. As principle investigator for this project, I have more than 20 years of experience with the use of the mouse model and 2 years with the zebrafish model, in biomedical research. In the lab, we have one dedicated *in vivo* technician and very experienced scientists that oversee the breeding of all animal lines, experiments and procedures, and new people are trained when required. The research lab has experience with the different experiments and techniques that are proposed for the project (e.g. intra-uterus injection in embryos, intravenous injection in adult, embryos and tissues collection, whole embryo multicolour staining, immunostaining on cryosections, confocal imaging of embryo/tissue slices after immunostaining).

**There are several reasons why we think that we can achieve our objectives within 5 years:**

- Part of the research described here was included in research proposals that were reviewed by independent experts in the field and were granted for funding [REDACTED] and were previously approved as DEC protocols. All animal procedures are currently being performed and are part of the ongoing projects. It is important to note, that there is overlap between the mouse studies described in this project and those in earlier DEC-approved protocols. After a license for this project has been obtained, all experiments will formally be executed under this new license.
- Work from my group [REDACTED] has resulted in seminal papers that described the required techniques.
- Our research and experiments are continuously being evaluated by various other researchers within and outside our institute. The scientists working in my group are selected based on their excellence and their commitment to our goals.

Our previous achievements make it very likely that we will be able to finish the project proposal in 5 years.

---

### 3.3 Relevance

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

The proposed work will result in the identification of molecular and cellular processes that drive





fluorescent, as GFP-positive cells transplanted in wild type recipients) that will allow the traceability of these cells and their progeny after transplantation. The fluorescent donor cells will also be easily distinguishable from the wild type recipients. Donor cells will be injected in the heart of mouse recipient embryos developing in the mother uterus. We will analyse *ex vivo* the tissues and cells collected from the growing recipients (cellular, molecular and histological analysis) to determine the long-term multi-lineage hematopoietic contribution of the donor cells. Only the tissues that will contain hemogenic endothelial cells or precursors will be able to produce HSCs in the recipient embryo and to provide long-term multi-lineage hematopoietic reconstitution in the growing recipients to adult age (see below the overall summary of the procedure). These experiments will determine which tissue/microenvironment (yolk sac, allantois or embryo proper) is at the origin of hemogenic endothelial cells, which produce later on HSCs.



**Sub-goal 2.** To identify the genes involved in the regulation of HSC production and to prove their functionality, we will modify candidate genes to test their function in HSC production in mice and zebrafish. During gene modification, a fluorescent marker (e.g. GFP) will be introduced to mark the genetically modified cells. After gene modification (see [Appendix 3.4.4.1](#)), tissues and cells will be isolated and analyzed *ex vivo* (See [Appendix 3.4.4.2](#)). Donor cells will also be used to perform *in vivo* transplantation assay (transplantation of WT or modified cells in adult or neonate recipients) (see [Appendix 3.4.4.3 and 3.4.4.4](#)). HSCs are identified in an *in vivo* assay where cells are transplanted intravenously in adult recipient mice. Pre-HSCs are too immature to engraft adult recipients but they are identified in an *in vivo* assay where cells are transplanted in the liver of neonates, which constitutes a more permissive environment than the adult bone marrow. Recipients (adults and neonates) are irradiated prior transplantation to clear out the bone marrow and liver from all proliferating cells and therefore to make space. It allows the engraftment of the injected donor cells. The hematopoietic tissues and cells of the transplanted recipients will then be analyzed *ex vivo* for donor (fluorescent) contribution (see [Appendix 3.4.4.3 and 3.4.4.4](#)). The presence of donor cells in all hematopoietic lineages and all hematopoietic tissues of the recipient at long-term will prove the presence of pre-HSCs or HSCs (see below the overall summaries of the procedures).



We will also generate genetically modified zebrafish but since no hampered phenotypes are expected, this activity does not require a CCD license. After gene modification, the zebrafish will be analyzed *in vivo* by live confocal imaging of the embryo (e.g. by imaging cell emergence, maturation, survival, proliferation and/or differentiation) and by *ex vivo* analysis of the hematopoietic embryonic/adult tissues. The observation of HSC or hematopoietic defect in the hematopoietic organs/cells of the animals where

---

gene modifications have been performed will indicate that these specific genes are important HSC regulators.

**Sub-goal 3.** The sub-goal 3 is to identify new markers to better identify, isolate and locate HSC precursors (pre-HSCs), HSCs and the cells in the surrounding microenvironment that constitute the supportive niche. For this purpose, cells will be sorted based on the expression of the potent new surface markers and transplanted in neonate (assay to identify pre-HSCs; see [Appendix 3.4.4.3](#)) and adult mice (assay to identify HSCs; see [Appendix 3.4.4.3](#)), and adult zebrafish (assay to identify HSCs; see [Appendix 3.4.4.4](#)). Hematopoietic tissues will also be collected during embryonic development and adult to locate and trace the cells based on the expression of the new markers. Pre-HSCs and HSCs must localise in the clusters in the aorta, and should be thereafter be present in the successive hematopoietic organs (placenta, yolk sac, liver and bone marrow). Cells from the supportive niche should be located close by to the pre-HSCs and HSCs (e.g. in the mesenchyme underneath the clusters in the aorta of the embryo). The correct localisation and function of the cells based on the expression of the new markers will indicate that these markers are reliable markers of pre-HSCs, HSCs or supporting cells from the microenvironment.

---

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.

---

The specific protocols that we apply to achieve our research goals are outlined below, in the flowchart and Appendix. All these animal procedures and their components are currently already on going in our lab.

#### **Generation, welfare assessment and breeding of wild type and genetically modified mice (Appendix 3.4.4.1)**

To study the function or behavior of a gene or a cell type relevant for HSC production, we will use appropriate mouse lines that are either already available or that need to be generated. New mouse line(s) will be generated via standard oocyte injection, blastocyst injection, or via the CRISPR/Cas9 system. The CRISPR/Cas9 system will especially be used as highly efficient tool for simultaneously multi-gene editing. This prevents the generation and breeding of multiple homozygotes from individually targeted ES cells (Reduction of the 3Rs).

In contrast to conventional gene-targeting strategy, the use of the Cre/LoxP recombination system in conjunction with gene targeting allows us to study the consequence of gene manipulation in a cell type specific manner. By incorporating Cre recombinase recognition sites (LoxP) into the genome, Cre expression from a specific promoter can drive gene disruption, activation or tracing in a cell type specific manner. New transgenic lines and/or KO lines generated via classical methods and/or novel combinations and used for breeding of these aforementioned lines will be monitored for 2 generations to determine the absence or presence of constitutional discomfort.

Cre recombinase expression can also be activated in an inducible manner by the addition of tamoxifen. To this end the Cre is flanked by 2 mutated estrogen receptors (Creert2, or merCremer) and will only allow for Cre activation when tamoxifen is administered.

#### **Collection of tissues and cells from wild type and genetically modified animals for *ex vivo* analysis and collection of donor cells for transplantations (Appendix 3.4.4.2)**

To study aspects of hemogenic endothelial cells or precursors origin, pre-HSC and HSC emergence and production as well as HSC progeny, we will isolate whole embryos, and hematopoietic tissues during embryonic development and in adults (from wild type or genetically modified mice and zebrafish). *Ex vivo* analysis will be performed on isolated tissues and cells. Donor cells will also be isolated to perform transplantations (see Appendix 3.4.4.3)

#### **Transplantation in recipients (pregnant females (embryos), newborns and adult mice) and *ex vivo* analysis (Appendix 3.4.4.3).**

To determine the anatomical origin of hemogenic endothelium, cells isolated from the embryo proper, allantois and yolk sac will be tested by performing *in utero* transplantations in embryos in pregnant mice. To test pre-HSCs and HSCs (wild-type and mutant), transplantation will be performed in neonates and adults, respectively.

Transplanted embryos and neonates will be analysed when they reach the adult stage. Adult mice will be analysed up to 4 months post-transplantation. Tissues and cells will be collected for *ex vivo* analysis (e.g. long-term multi-lineage hematopoietic reconstitution of donor origin).

---

#### **Transplantation in zebrafish, live imaging and ex vivo analysis (Appendix 3.4.4.4).**

Genetically modified and wild type animals will be analysed for HSC production. For this purpose, the zebrafish will be subjected to transplantation, *in vivo* analysis (live time-lapse confocal imaging) and *ex vivo* analysis (histology, DNA/RNA analysis...).

#### **Generation, welfare assessment and breeding of wild type and genetically modified zebrafish**

Overall, we will generate genetically modified zebrafish but since no hampered phenotypes are expected, this activity does not require a CCD license.

(see <https://www.centralecommissiedierproeven.nl/actueel/nieuws/16/10/13/handreiking-genetisch-gewijzigde-dieren> ; genereren, fokken, genotypen, monitoren en huisvesten van genetisch gewijzigde dieren).

---

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.

See also Flow Chart in attachment.

All experiments are based on the preliminary identification of candidate genes or cell types. The identified genes or cell types will initially be carefully tested in tissues from embryo samples and in *in vitro* experiments. If the identified genes or cell types show an interesting expression pattern or phenotype, we will consider the extensive and careful analysis of (compound) GMO for our *in vivo* experiments. If the desired genotype is not available, we will create them ourselves. **Before generating a new GMO line, the gene of interest will be studied based on the literature. The expression pattern of the gene in embryonic tissues will be carefully examined by *in vitro* analysis (e.g. *in situ* hybridization, flow cytometry analysis); go/nogo for the generation of a new GMO**

We will only use well-established reagents and protocols to induce expression or deletion of the candidate gene/s in mice (Appendix 3.4.4.1) and zebrafish.

**New GMO lines will only be generated for the most promising regulator genes. Their role will be tested on HSCs by *in vivo* transplantation assays. One transplantation experiment will be performed and analyzed to decide if the gene is indeed a potent interesting HSC regulator (e.g. observation of less mice reconstituted 4 months post-transplantation of GMO cells [where the gene is inactivated] compared to WT cells). Only then, more mice will be transplanted to reach n=3 independent experiments."**

Our three sub-goals are of equivalent importance. Therefore, our strategy is to conduct experiments to try to answer all sub-goals in parallel (and not sequentially).

To address the role of candidate genes or cell types on hemogenic endothelium, pre-HSC and HSC production in the mouse model, *in vivo* transplantation will be performed in embryos, newborns and adult, respectively (Appendix 3.4.4.3). *Ex vivo* analysis on collected cells and tissues will be done to analyse the role of candidate genes or hematopoietic cells on the hematopoietic contribution.

In some cases we will use our animal lines without any intervention for the collection of tissues or cells for *ex vivo* analysis.

To address the role of candidate genes or cell types on HSC production in the zebrafish model, *in vivo* transplantation will be performed in adult (Appendix 3.4.4.4). Time-lapse live confocal imaging and *ex vivo* analysis on whole zebrafish and collected cells/tissues will be done to analyse the role of candidate genes or hematopoietic cells on the hematopoietic contribution, respectively.

Whenever possible, for all the *in vivo* experiments, we will perform pilot studies with the minimum amount of animals possible. It means that we will perform one experiment and will wait for the read-out result before to perform a complete set of experiments (e.g. we will wait for the result of the pilot experiment before to do the n=3 experiments requested to validate an analysis). We designed the experiments very carefully, to reduce the amount of cumulative discomfort and/or the number of animals. For each experiment, the best trade-off will be made.

---

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	Generation of new GMO (mice)
2	Donor – <i>Ex vivo</i> analysis (mice, zebrafish)
3	Recipient – <i>Ex vivo</i> analysis (Transplantation in pregnant females, newborns and adult mice)
4	Transplantation in zebrafish, live imaging and <i>ex vivo</i> analysis (embryo till adult)
5	
6	
7	
8	
9	
10	

AVD 80100 2017 1047

The cellular and molecular basis of the hematopoietic production

Overview number of animals and Animal Procedures

Procedure	Title	Species	Stage	Mild	Moderate
3.4.4.1	Generation of new GMO (mice)	Mouse	Adult		3000
3.4.4.2	<i>Donor – Ex vivo analysis (mice and zebrafish)</i>				
3.4.4.2a	Pregnant females for embryos	Mouse	Adult	2205	
3.4.4.2b	E18 embryos	Mouse	Embryos	378	
3.4.4.2c	Newborns	Mouse	Newborn	720	
3.4.4.2d	Adults	Mouse	Adult	126	
				3429	
3.4.4.3	<i>Recipient – Ex vivo analysis</i>				
3.4.4.3a	Pregnant females for embryo transplants	Mouse	Adult		240
3.4.4.3b	Resulting embryos	Mouse	Adult	1440	
3.4.4.3c	Transplants in newborns	Mouse	Newborn	2268	
3.4.4.3d	Transplants in adults	Mouse	Adult	2016	
				5724	
3.4.4.4	Transplantation in zebrafish, live imaging and ex vivo analysis	Zebrafish	Adult	4992	

Total:

12.393 mice of which 3240 will have maximally moderate discomfort (27%) and 9153 with mild discomfort (73%)

4992 zebrafish with maximally mild discomfort = 100%



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	80100 - KNAW	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	[REDACTED]	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		3.4.4.2	Donor – Ex vivo analysis (mice, zebrafish)

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The general design of the experiments in this appendix is shown in the attached flowchart (B).

To identify, localize and test hemogenic endothelial cells or precursors, HSC precursors (pre-HSCs) and HSCs, these cells will be isolated from WT or GMO. Cells and tissues will be collected from embryos, neonates and adults and tested in ex vivo assays and in transplantations (Flowchart B [mouse] and C [zebrafish]).

##### \* Animal models (mouse, zebrafish)

There are several considerations to choose for a specific animal type:

- WT. They will be used to provide WT tissues or cells for ex vivo analysis (control) and to provide donor cells for transplantation experiments (see Appendix 3.4.4.3 [mouse] and 3.4.4.4 [zebrafish]).

- GMO will be used to provide donor tissues or cells for ex vivo analysis and to provide donor cells for transplantation experiments (see Appendix 3.4.4.3 [mouse] and 3.4.4.4 [zebrafish]).  
GMO will be used to study the HSC function of a specific gene or type of (stem) cell. Several transgenic or mutant strains will be used. They are needed for several reasons: (1) the presence of a genetic marker is needed to trace the cells and their progenitors after transplantation; (2) to study a specific marker; (3) to study the influence of a gene (known to be important for hematopoiesis) upon the biology of (stem) cells.

In some cases, transgene inducing or deleting agents (e.g. tamoxifen) are administered to induce the expression of the fluorescent marker in a specific cell type/lineage or to change the expression of the functional gene (transgene knockout). The hematopoietic tissues and cells of the GMO will be collected (see Flowchart B1 and C1) and analysed ex vivo (see Flowchart B2 and C2). We will also use endogenous



and exogenous promoters that are tissue or cell specific to drive expression of genes. The presence of e.g. a fluorescent marker in a (putative) stem cell allows us to localize these cells by confocal imaging. The introduction of e.g. a toxin receptor (e.g., Diphtheria toxin receptor) in the cells allows us to specifically kill these cells upon the administration of the toxin (e.g. Diphtheria toxin). It allows us to determine the consequence of the loss of the toxin receptor expressing cells during development and for tissue homeostasis.

If a required GMO is not available, we will obtain this model by generating, importing or by crossing existing models (see Appendix 3.4.4.1).

The choice of animals will in all cases be based on the combination of the following considerations:

- Aim/ specific question (e.g. Identification of pre-HSCs, of HSCs, of hemogenic endothelial cells or precursors, of a cell type specific expression of a fluorescent marker for an immune-histochemical study)
- Aim/readout parameters (e.g. ex vivo assay)

**\* Interventions:**

- Donor cells and tissues will be collected from embryos, neonates and adults (see Flowchart B and C).
- With the administration of small molecule compounds/drugs/chemicals/toxins, we might be able to rescue or mimic the phenotypes of the in vivo genetic deletion(s) and/or activation(s) and therefore further identify the function of these cells. The animals might be injected with DNA labelling agents shortly before euthanasia to measure the proliferation capacity of the stem cells and their derivatives ex vivo.

**\* Readout parameters /endpoint:**

- To study the molecular and/or cellular mechanisms of HSC production, we need to analyse tissues and cells ex vivo. Cells and hematopoietic tissues will be collected from embryos, newborns and adults (WT and GMO).

---

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

- Animals are ordered from a commercial NVMA licensed breeder or from a registered commercial company, or are generated by us under appendix 3.4.4.1.
- Animals will be used as donor of tissues/cells for ex vivo studies or as donor for subsequent transplantations

**\* Mouse model:**

- Donor pregnant females used to collect donor tissues/cells from embryos (see Flowchart B and B1). Pregnant female will be used to generate the donor embryos. The pregnant females will be euthanized by CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> followed by CO<sub>2</sub> inhalation. After disinfection of the fur with 70% ethanol, a two-sided incision will be made in the fur and skin in the abdominal area. Using sterile forceps, the uterus will be pulled out and place in a culture dish-containing medium. The embryos and extra-embryonic tissues (allantois and yolk sac) will be isolated. Embryos from different ages (E8, E9, E10, E11, E12, E14 and E18) will be used to test the presence of pre-HSCs and HSCs in intra- and extra-embryonic tissues.

- Newborns and adult mice used as donors (see Flowchart B and B1)  
Newborns and adult mice will be used to collect hematopoietic cells and tissues to test the presence of pre-HSCs and HSCs.

In some cases, we will perform the administration:

- transgene inducing or deleting agents or control substances, alone or in combination, continuously or intermittently by one or more of the following routes:
  - a) in diet or drinking water (maximally 1 time, < 2 wks)
  - b) subcutaneous (in general 2 times but maximally 3 times)
  - c) intraperitoneal (in general 4 times but maximally 7 times)
  - d) implantation of a slow release pellet subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia (maximally 1 time)
  - e) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia (maximally 1 time)
  - f) oral (in general 5 times but maximally 10 times)

- small molecule compounds, drugs, toxin, chemicals or control substances, alone or in combination, continuously or intermittently by one or more of the following routes:

- a) in diet or drinking water (maximally 1 time, < 2 wks)
- b) subcutaneous (in general 5 times but maximally 10 times)
- c) intraperitoneal (in general 5 times but maximally 10 times)
- d) implantation of a slow release pellet subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (maximally 1 time)
- e) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (maximally 1 time)
- f) oral (in general 5 times but maximally 10 times)

- labeling agent (e.g. BrdU) via one of the following routes:

- a) intraperitoneal (maximally 1 time but maximally 3 times)
- b) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (maximally 1 time)
- c) intravenous (maximally 1 time)

*None of the presented administration procedures will result in higher than cumulative mild discomfort.*

Readout parameters /endpoint (see Flowchart B2)

The pregnant females will be kept under observation until delivery of the newborns. After birth and short weaning of the newborns (< 5 days), the mother will be euthanized by CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> followed by CO<sub>2</sub> inhalation. Embryos and neonates (< 5 days) will be put on melting ice water for 10 min (but not in contact with) after which they will be decapitated and the head immediately frozen. The adult mice are sacrificed by CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> followed by CO<sub>2</sub> inhalation or via cervical dislocation. Embryos and embryonic tissues (yolk sac, allantois), and neonate and adult tissues (e.g. blood, bone marrow, spleen, thymus, lymph nodes) will be collected for ex vivo analysis (e.g. in situ hybridization, flow cytometry analysis, molecular biological analysis (PCR), histological analysis to look at aspects of cell size, survival, proliferation and differentiation).

\* Zebrafish model:

All donor tissues and cells will be collected before 5 dpf and, therefore, these zebrafish are not part of the license.

---

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

The animal numbers are mainly based on our preliminary experience. We know that the analysis of the requested number of animal per experiment guarantees us a proper analysis of these animals. We have tried to reduce the number of animals per experiments to a minimum. Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a  $p < 0.05$ .

Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based in literature and/or years of experience with similar type of experiments. Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of animals per group that will be informative. The very low number of cells available from early embryonic tissues (embryo proper, allantois or yolk sac) implicates the use of a higher number of embryos and therefore of pregnant female mice. All mice will be euthanized to collect the embryonic tissues and therefore will only be used once. The number of pregnant female mice (carrying donor embryos) needed has also been calculated according to the average number of embryos per litter (6 embryos/litter), to the number of embryos needed to test the different tissues at different embryonic stages, and the number of cells that will be available for analyses.

---

## **B. The animals**

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

---

All animals will be used to provide tissues/cells for ex vivo analysis and to provide donor cells for transplantation experiments (see Appendix 3.4.4.3 [mouse] and 3.4.4.4 [zebrafish]). To note, the number of experiments needed is based on your experience over the last years and my expectation that my workgroup has a rather stable number of experienced researchers involved.

### **1- Mus musculus, (WT, GMO)**

Genetic background: C57Bl6

Age; embryos, newborns, adults

Genders: both males and females will be used.

Origin: Mice are obtained from our own Institute or from external licensed breeders.

**Number of animals (Total in 3.4.4.2): max. 3429**

For the majority of the proposed studies, the mouse (beside the zebrafish) is one of the most appropriate animal model to use because: (1) like humans, mice are mammals; (2) physiology is more extensively characterized; (3) mice are amenable to transgenic modification; (4) a large number of relevant transgenic and knock out lines are already available.

#### - Donor pregnant females used to collect donor tissues/cells from embryos and neonates

Donor pregnant females are needed:

(i) to generate embryo, yolk sac and allantois.

Based on our previous experience, there is an average of 6 embryos/litter.

Seven embryonic stages (E8, E9, E10, E11, E12, E14 and **E18; see below**) will be tested because they correspond to a specific time points of hematopoietic (stem) cell specification, emergence, maturation, colonization and expansion. Pluggings will be performed with wild type and GMO. The experiments will be performed three times for each assay to be scientifically reliable.

The cell populations of putative precursors in the embryo proper, allantois and yolk sac are very small at early time points of development. Thus, many embryos will be needed to be able to perform *ex vivo* analysis. Moreover, only up to 50% of the pups in the litters will carry a donor marker (e.g. fluorescent marker) and thus an average of 3 pups will be used per litter, with 5 litters needed per experiment (for a total of 3 experiments). The mothers will be killed for each experiment.

Therefore we need:

→ 7 (embryonic stages) x 5 (females/experiments) x 21 (1 WT and 20 GMO) x 3 (experiments) = **2205 mice**.

#### - E18 embryos used to collect donor tissues/cells

Different hematopoietic tissues will be collected from WT and GMO E18 embryos for ex vivo analysis. An average of 6 embryos will be needed per experiment to collect enough cells and tissues. The experiments will be performed three times for each assay to be scientifically reliable.

Therefore we need:

→ 6 (E18 embryos) x 21 (1 WT and 20 GMO) x 3 (experiments) = **378 embryos**.

#### - Newborns used to collect donor tissues/cells

To determine the presence of Pre-HSCs in any given sample (Boisset *et al.* Blood, 2015), an average of 12 newborns will be used per experiments.

Therefore we need:

→ 120 (pregnant females – see above) x 6 (neonates) = **720 newborns**.

#### - Adults used to collect donor tissues/cells

Different hematopoietic tissues will be collected from WT and GMO for ex vivo analysis. An average of two mice will be needed per experiment to collect enough cells and tissues. The experiments will be performed three times for each assay to be scientifically reliable.

Therefore we need:

→ 2 (mice) x 21 (1 WT and 20 GMO) x 3 (experiments) = **126 mice**.

### **2- Zebrafish (WT, GMO):**

All donor tissues and cells will be collected before 5dpf and therefore these zebrafish are not part of the

license.

### **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.

Animal studies are unavoidable if we seek for the fundamental insight into the molecular and cellular mechanisms that drive HSC production and regulation.

We make extensive use of *in vitro* experiments where possible, which extensively reduces the animal numbers. The use of *in vitro* cultures/assays allows this project to comply with the 3Rs (replacement, reduction and refinement) by keeping the mice numbers to be used to a minimum. Indeed, our *in vitro* data, consisting of flow cytometry analysis and *in situ* hybridization experiments, have permitted to tremendously reduce our long list of potent HSC regulators to 20 (see Preliminary data in part 3.1)). Based on these data, available literature and interactions with other scientists, we will now study the functional role of these genes during endothelial specialization, endothelial into hematopoietic transition, pre-HSC maturation, HSC survival and/or expansion or involved in the supportive surrounding microenvironment. The functionality of these gene scan only be performed in vivo (in transplantation assays).

Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible.

Where possible, mice with inducible alleles will be used, so mice should not display a phenotype before the induction of the alleles.

Experiments will be done sequential, where on basis of the results, decisions will be made on the next steps.

If homozygous mice do not show any discomfort, we will keep the mice on a homozygous background, thereby reducing the number of mice.

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects.

## **Repetition and duplication**

### **E. Repetition**

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

The experiments in this project are not carried out due to legal requirements.

## **Accommodation and care**

### **F. Accommodation and care**

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

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

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

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

- Anaesthesia will be administered (by inhalation) to mice in case of blood collection (in general: Isofluraan (4%)).

- Analgesia will be administered to mice in case of pain (in general: Rimadyl)

- Parameters for health monitoring: Mice will be kept as groups. Food and drinking water will be provided ad libitum. Animals will be monitored for health status (welzijnsdagboek) by the animal caretakers. Animals with a decreased health status (such as weight loss, bristly fur, bent back) will be checked by the researcher as well. In case of 15% loss of body weight within 2 days, the mice will be euthanized. In case of 20% loss of body weight compared to the littermates, the mice will be euthanized.

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

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

Other than in terminally anaesthetized animals dosing and sampling procedures will be undertaken using a combination of volumes, routes and frequencies that will result in no more than transient, mild discomfort. In less than 3% of all experiments, pumps/pellets will be implanted which leads to a moderate discomfort.

Due to administration of inducing agents or other substances, animals will be experiencing no follow up effects.

The scientific endpoints of all studies are much earlier than the humane endpoints.

It is not expected that the activation or inactivation of genes will lead to discomfort. However, it is impossible to predict the nature or severity of any potential genetic defect. So, in all cases, animals will be careful monitored for possible side effects. Animals exhibiting any unexpected harmful phenotypes will be killed within a day and analysed.

Explain why these effects may emerge.

Mice might have sickness and/or disorientation signs after waking up from anesthesia (after blood

collection) and have some pain due to the surgery. Analgesia will be administered accordingly.

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

Monitoring of the animal combined with an experimental design aiming at reducing the discomfort of the animals. If we unexpectedly observed weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behavior or body posture, signs of general sickness and/or discomfort animals will be taken out of experiment and sacrificed.

#### 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.

Weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behaviour or body posture, and signs of general sickness and/or discomfort.

Indicate the likely incidence.

Expected <5%, mild <1day.

#### 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').

Pregnant females; n = 2205; Mild

E18 embryos; n=378; Mild

Newborns; n = 720; Mild

Adult mice; n = 126; Mild

Total = 2331 adult mice and 720 newborns

- Waking up from anaesthesia (after blood collection): Mice might have sickness and/or disorientation signs. Mild, < 1 day, expected 100%.

- Sacrifice: Mild, < 10 minutes, 100% animals

### End of experiment

#### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The animals need to be killed to collect embryos, cells or tissues for *ex vivo* analysis and to provide donor cells for transplantation experiments.

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

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

Yes

## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	80100 - KNAW	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	[REDACTED]	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.  <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	3.4.4.3	Recipient – <i>Ex vivo</i> analysis (Transplantation in pregnant females, newborns and adult mice)

#### 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.

The general design of the experiments in this appendix is shown in the attached flowchart (B3 and B4).

To identify and test hemogenic endothelial cells or precursors, HSC precursors (pre-HSCs) and HSCs isolated from WT or GMO (see Appendix 3.4.4.2), we need to perform in vivo transplantation assays in embryos in pregnant females (1), newborns (2) and adults (3), respectively (Flowchart B3). The different ages of the recipients provide different permissive microenvironment and allow the engraftment of various cell types (from the embryo to adult age). Hematopoietic tissues and cells of all transplanted recipients (embryos, neonates, adults) will be analysed ex vivo at 4 months post-transplantation (Flowchart B4).

(1) To determine the anatomical origin of hemogenic endothelial cells or precursors, cells (isolated from donor embryos, see Appendix 3.4.4.2) will be tested by performing transplantations in embryo recipients directly in pregnant recipient females (E7-E10). The recipient embryos will be analysed when they reach the adult stage for long-term donor multi-lineage hematopoietic reconstitution.

(2) To identify pre-HSCs, isolated candidate donor cells (see Appendix 3.4.4.2) are transplanted in newborns or immuno-deficient recipient mice (a more permissive environment for immature cells).

(3) To identify HSCs, isolated candidate donor cells (see Appendix 3.4.4.2) are transplanted in adult recipient mice.

In all cases, the primary recipients are analysed up to 4 months post-transplantation (to prove the multi-lineage property of the donor cells). Secondary transplantations are performed to prove the self-renewal property of donor cells. These secondary recipients are also analysed 4 months post-transplantation.

### **\* Mouse model**

There are several considerations to choose for a specific mouse model. WT and GMO mice will be used as recipients.

- WT and GMO:

GMO will be used to study the HSC function of a specific gene or type of (stem) cell. Several transgenic or mutant mouse strains will be used. They are needed for several reasons: (1) the presence of a genetic marker is needed to trace the cells and their progenitors after transplantation; (2) to study a specific marker; (3) to study the influence of a gene (known to be important for hematopoiesis) upon the biology of (stem) cells.

In some cases, transgene inducing or deleting agents (e.g. tamoxifen) are administered to induce the expression of the fluorescent marker in a specific cell type/lineage or to change the expression of the functional gene (transgene knockout). We will also use endogenous and exogenous promoters that are tissue or cell specific to drive expression of genes. The presence of e.g. a fluorescent marker in a (putative) stem cell allows us to localize these cells by confocal imaging. The introduction of e.g. a toxin receptor (e.g., Diphtheria toxin receptor) in the cells allows us to specifically kill these cells upon the administration of the toxin (e.g. Diphtheria toxin). It allows us to determine the consequence of the loss of the toxin receptor expressing cells during development and for tissue homeostasis.

To identify/validate for example which molecular and cellular processes are important for HSC production and regulation, we will analyse GMO in which cells/tissues are transplanted and the gene(s) will be activated, inactivated, overexpressed and/or misexpressed. These mice will be used as recipients (see Flowchart B3). We will use inducible systems including e.g. the well-known Cre-LoxP system in which a floxed gene can be deleted, overexpressed or misexpressed upon the induction of the Cre enzyme via the administration of tamoxifen. In particular, when Cre is expressed in mice harbouring a LoxP-containing target gene, the desired gene modification can be restricted to certain developmental stage, organ, cell type (e.g. stem cell) of the mouse depending on the specificity and timing of recombinase expression. In this way the desired gene modification can be restricted to certain developmental stage, organ, cell type (e.g. stem cell). Successful deletion/activation via (e.g.) Cre enzyme induction might be monitored via expression of a reporter gene (e.g. LacZ or fluorescent protein(s)).

If a required genetically modified mouse is not available, we will obtain this model by generating, importing or by crossing existing models (see Appendix 3.4.4.1). WT recipients serve as control.

- Immune-deficient or newborn recipients. Immune-deficient mice are required in some cases as recipients since they are more permissive to the engraftment of very immature cells.

The choice will in all cases be based on the combination of the following considerations:

- Aim/ specific question (e.g. Identification of pre-HSCs, of HSCs, of hemogenic endothelial cells or precursors, of a cell type specific expression of a fluorescent marker for an immune-histochemical study)
- Aim/readout parameters (e.g. to test long-term hematopoietic repopulation)

### **\* Interventions:**

- Cells will be transplanted intra-cardiac in embryo recipients, intra-liver in newborn recipients and intravenously in adult recipients (see Flowchart B3). Newborns and adult recipients will be irradiated. The irradiation is performed to clear out the bone marrow and liver from all proliferating cells and therefore to make space. It allows the engraftment of the injected donor cells.

- To identify/validate for example which molecular and cellular processes are important for HSC production and regulation, we will analyze wild type mice or GMO (in which functional gene(s) will be activated, inactivated, overexpressed and/or misexpressed) after transplantation. The presence of e.g. a fluorescent marker in transplanted cells allows us to visualize these cells and their progeny.

- With the administration of small molecule compounds/drugs/chemicals/toxins, we might be able to rescue or mimic the phenotypes of the *in vivo* genetic deletion(s) and/or activation(s) and therefore further identify the function of these cells *in vivo*. The mice might be injected with DNA labeling agents shortly before euthanasia to measure the proliferation capacity of the stem cells and their derivatives.

### **\* Readout parameters /endpoint:**

To study the molecular and/or cellular mechanisms of HSC production, we need to analyze tissues and cells *ex vivo*. Cells and hematopoietic tissues will be collected from up to 4 months after transplantation (see Flowchart B4).



In some cases, we will need to collect cells with a certain genetic constitution to transplant back into wild type or GMO (secondary transplantation).

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

Mice are ordered from a commercial NVMA licensed breeder or from a registered commercial company, or are generated by us under appendix 3.4.4.1.

- Recipient pregnant females used for the in-uterus transplantation in E7-E10 embryos (see Flowchart B3)

Pregnant females will be used to generate recipient embryos (immune-deficient or wild type). Between E7 to E10 post-coitus, the pregnant females will be anaesthetized in a knock down box and then maintained by facemask with 2-3% Isoflurane. Hairs will be removed on the abdomen using a depilatory cream and then the abdomen will be rinsed with water. The female will be positioned on a platform ventral side up. Eye lubricant will be placed on each eye to prevent drying. A small amount of ECG gel will be placed on the copper leads on the platforms and the paws taped on them. This will provide the ECG and respiratory physiology of the mouse. A rectal probe will be inserted to monitor the temperature of the animal during the imaging session and will be maintained at 35-38°C using a heating pad and a lamp. The stage upon which the mouse is placed is tilted head down (between 35–45°) to displace the bowel. Maternal well-being will be carefully monitored to maintain an appropriate body temperature, heart rate, respiratory vigour, and anaesthetic depth throughout the procedure. After sterilizing the skin with 70% ethanol, the abdomen will be opened with a 2 cm vertical midline incision along the linea alba (midline avascular region). A short segment of the uterine horns containing 1-3 embryos will be gently exteriorized from the abdominal cavity by using sterile forceps. With an injection needle, a small hole will be made in the uterus. Through this hole, the cells will be injected into the heart cavity of the embryo by using a glass transfer needle in combination with a micro-injector (guided by a high resolution ultrasound apparatus). This will allow the injection of very small volumes of cells (50 nL) while causing little damage to the tissue. The embryo is positioned in such a way that the heart is visible with the high-resolution ultrasound detector. Special care will be made for the tissues through which the needle will pass through before hitting the target of interest (the heart), especially by avoiding passing through the placenta (that might compromised the embryo development or generate bleeding). All embryos from the litter will be injected. After injection, the uterus will be guided back into the abdomen, muscle layer will be stitched and the skin will be closed with staples by using a wound clamp. The whole procedure will take about 20-30 minutes. To prevent cooling down of the recovery mouse, the cage will be put on a heating plate.

- Newborns and adult mice used as recipients (see Flowchart B3)

Transplantation of cells will be performed under adequate anaesthesia and analgesia.

→ Transplantation in newborns

\* Wild-type or immuno-deficient newborns (1 to 5 days old) will be used. WT newborns will be treated to compromise their hematopoietic/immune system (by irradiation of the newborns [using a gamma-source] or by busulfan treatment of the pregnant females [to compromise the hematopoietic/immune system of the litter while still inside the uterus of the mother]). For irradiation, neonates will receive a single dose of 5 Gy. During irradiation, mice will be kept as a group in a cage without anaesthesia.

\* Donor cells are injected in the livers of the newborns (max. 0.05 ml).

\* Mice will receive antibiotics (such as neomycin) in the drinking water for the first 3 months post transplantation. The animal being irradiated, they are more subject to bacterial infections (until their immune system is restored. The antibiotics will prevent such possible infection.

→ Transplantation in adults (primary and secondary transplantation)

\* Adult wild-type mice (>8 weeks) will be treated to eliminate their hematopoietic/immune system by irradiation using a gamma-source or 5-FU treatment. For irradiation, adults will receive a sub-lethal dose as a split dose (4 and 5 Gy with 3 hours in between). During irradiation, mice will be kept as a group in a cage without anaesthesia.

\* Donor cells are injected intravenously (max. 0.2 ml) in the tail vein.

\* Mice will receive antibiotics (such as neomycin) in the drinking water for the first 3 months

post transplantation to prevent bacterial infections.

Cells of reconstituted recipients will serve as donor cells for secondary transplantations (to test the self-renewal of the cells, second specific feature of a HSC). The adult secondary recipients will receive a sub-lethal dose of irradiation as a split dose (4 and 5 Gy with 3 hours in between), as described above.

All transplanted animals will be kept under observation and analysed at adult stage when they are older than 8 weeks old (see Flowchart B4).

**Summary of the transplantation procedures:**

<b>Assay</b>	<b>To test/To identify</b>	<b>Donor cells</b> <i>(see Appendix 3.4.4.2)</i>	<b>Recipient</b>
In uterus transplantation	Hemogenic endothelial cells (or precursors)	E8 embryo, yolk sac, allantois	Embryo (E7-E10)
Newborn transplantation	Pre-HSCs	Embryonic tissues (E8-E10)	Newborn (P1-P5)
Adult transplantation	HSCs	Embryonic tissues (E10-E12, E14 and E18)	Adult mice (> 8 weeks)

In some cases, we will perform the administration of:

- transgene inducing or deleting agents or control substances, alone or in combination, continuously or intermittently by one or more of the following routes:

- a) in diet or drinking water (maximally 1 time, < 2 wks)
- b) subcutaneous (in general 2 times but maximally 3 times)
- c) intraperitoneal (in general 4 times but maximally 7 times)
- d) implantation of a slow release pellet subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia (maximally 1 time)
- e) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia (maximally 1 time)
- f) oral (5 times but maximally 10 times)

- small molecule compounds, drugs, toxin, chemicals or control substances, alone or in combination, continuously or intermittently by one or more of the following routes:

- a) in diet or drinking water (maximally 1 time,, <2 wks)
- b) subcutaneous (in general 5 times but maximally 10 time)
- c) intraperitoneal (in general 5 times but maximally 10 times)
- d) implantation of a slow release pellet subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (maximally 1 time)
- e) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia (maximally 1 time)
- f) oral (in general 5 times but maximally 10 times)

- labeling agent (e.g. BrdU) via one of the following routes:

- a) intraperitoneal (in general 1 time maximally 1 times)
- b) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (maximally 1 time)
- c) intravenous (maximally 1 time)

None of the presented administration procedures will result in higher than cumulative mild discomfort.

**Readout parameters /endpoint (see Flowchart B4)**

After transplantation, the recipient animals will be kept under observation. In the case of transplantation in embryos, the pregnant females will be kept under observation until delivery of the pups. The pups will be checked at birth for viability. Pups will be kept (males and females separated) and analyzed at adult stage.

Blood (maximum volume at the different time points: 300 µl) will be collected at 1 or 2 time points: 1-2

months and/or 4-6 months post transplantation to determine the donor cell contribution in the peripheral blood. At the end of the experiment (4-6 months post transplantation), all mice are sacrificed by CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> followed by CO<sub>2</sub> inhalation or via cervical dislocation, and tissues/cells are collected for ex vivo analysis. The long-term multi-lineage hematopoietic reconstitution will be tested by flow cytometry analysis or by molecular biological analysis (PCR on GFP). For this, cells or DNA will be isolated from the different adult mouse hematopoietic tissues (blood, bone marrow, spleen, thymus, lymph nodes). Tissue will be collected for histological and molecular analysis to look at aspects of cell size, survival, proliferation and differentiation. In some cases, cells will be collected to perform secondary transplantations. Embryos and newborns (< 5 days) will be put on melting ice water for 10 min. (but not in contact with) after which they will be decapitated and the head immediately frozen. After birth and weaning of the pups (that are used as embryo recipients), the mother will be euthanized by CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> followed by CO<sub>2</sub> inhalation. For post-surgery pain relief, when anaesthetised, a s.c. dose of Rimadyl will be given in general. One injection will be made once pre-operatively and repeated once 24 hours after surgery. We have expertise in all the surgical procedure steps needed for the experiments.

The cumulative discomfort in the genetic models will maximally consist of discomfort due to:

- the genetic modification (< 5% of lines)
- transplantation of cells under adequate anaesthesia and analgesia
- sacrifice

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

The mice numbers are mainly based on our preliminary experience. We know that the analysis of the requested number of mice per experiment guarantees us a proper analysis of these mice. We have tried to reduce the number of animals per experiments to a minimum. Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a  $p < 0.05$ .

Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based in literature and/or years of experience with similar type of experiments. Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative. The very low number of cells available from E8 tissues (embryo proper, allantois and yolk sac) implicates the use of a higher number of embryos and therefore of pregnant females. All mice will be euthanized to collect the embryonic tissues and therefore will only be used once. The number of pregnant females (carrying recipient embryos) needed has also been calculated according to the average number of embryos per litter (6 embryos/litter), to the number of embryos needed to test the different tissues at E8, and the number of cells that will be available for analyses (very low at E8).

## **B. The animals**

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

Mus musculus, (WT, genetically modified, mutants, immuno-deficient mice)

Genetic background: C57Bl6

Age; embryos, newborns, adults

Origin: Mice are obtained from our own Institute or from external licensed breeders.

**Genders: both males and females will be used.**

### **Number of animals (Total): max. 5964**

Up to today, there are no alternative methods than in vivo transplantation to fully study HSC production and regulation in the context of the whole organism. For the majority of the proposed studies, the mouse is one of the most appropriate animal model because: (1) like humans, mice are mammals; (2) physiology is more extensively characterized; (3) mice are amenable to transgenic modification; (4) a large number of relevant transgenic and knock out lines are already available.

To note, the number of experiments needed is based on your experience over the last years and my expectation that my workgroup has a rather stable number of experienced researchers involved.

### **A) In utero transplantation in embryos in pregnant females**

#### - Pregnant females used to generate E7-E10 recipient embryos

The recipient females give an average litter size of 6. We need a minimum of 12 pups (2 litters) injected for a valid and reliable conclusion. Pups will be injected with 3 different cell populations from E8 allantois, yolk sac and embryo proper (= 3 kind of tissues). All embryos from the litter will be injected by the same cell type (since embryos cannot be marked at that stage to be discriminated at birth). The pregnant mice will be injected at E7, E8, E9 and E10 because the stage that will provide the best engraftment is unknown yet. Because the intra-cardiac injection in embryos is difficult, we know by experience that an average of 10 experiments are needed per tissue tested to achieve a reliable (and therefore publishable) data.

Therefore we need:

→ 4 (embryonic stages) x 2 (females/experiments) x 3 (kind of tissues) x 10<sup>#</sup> (experiments) = **240 transplanted pregnant mice.**

<sup>#</sup> Intra-cardiac injection in developing embryos is very difficult to achieve. Sometimes (i) the needle misses the heart and cells are not injected properly, (ii) the embryo does not survive to the procedure or (iii) there is a blockage in the needle and all cells cannot be injected. For these reasons, we estimated that 10 experiments are needed for a reliable conclusion (in comparison to all other experiments [that are technically easier and 100% successful in our hands] where 3 experiments are needed for statistical analysis).

#### - Growing transplanted embryo recipients (that will be analysed at adult age)

The amount of transplanted embryo recipients to analyse for long-term multi-lineage reconstitution at adult age is:

→ 240 (transplanted pregnant females – see above) x 6 (embryos/litter) = **1440 adults transplanted when at embryonal stage.**

### **B) Transplantation in newborns (pre-HSC assay)**

#### - Newborn recipients for transplantation:

To determine the presence of Pre-HSCs in any given sample, we need to do transplantations in newborn recipients (Boisset *et al.* Blood, 2015).

We need a minimum of 12 newborns injected for a valid and reliable conclusion. Newborns will be injected with cells isolated at 3 different time points (E8, E9 and E10; 3 time points when pre-HSCs are detectable; isolated under AP 3.4.4.2). The experiments will be performed three times for each assay to be scientifically reliable with WT and GMO lines.

Therefore we need:

→ 3 (embryonic stages) x 12 (newborns) x 21 (1 WT and 20 GMO) x 3 (experiments) = **2268 newborn recipients.**

### **C) Transplantation in adults (HSC assay)**

#### - Adult recipients for transplantation:

To determine the presence of HSCs in any given sample, we need to do transplantations in adult recipients (Harrison *et al.* Experimental Hematology, 1993; Szilvassy *et al.* PNAS, 1990). Adults will be injected with donor cells isolated at 5 different time points (E10, E11, E12, E14 and E18; 5 time points when HSCs are detectable in different tissues; isolated under AP 3.4.4.2). Based on literature and our own experience we estimate the variation per group at 15% (= anticipated coefficient of variation). The difference that we need to be able to detect is 15% (= difference considered meaningful). To get a power of 0.8 with the aforementioned percentages, we will need a group size of 18 animals in total (Van Zutphen *et al.*, Principles of laboratory animal science). For secondary transplantations (a requirement for the self-renewal feature of a HSC), we use 6 recipients in total (standard in the field).

Therefore we need:

→ 5 (embryonic stages) x 18 (6 mice x 3 experiments) x 21 (1 WT and 20 GMO) = **1890 adult recipients** (1<sup>st</sup> Tx)

→ 6 (2 mice x 3 experiments) x 21 (1 WT and 20 GMO) = **126 adult recipients** (2<sup>nd</sup> Tx)

### 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.

Animal studies are unavoidable if we seek for the fundamental insight into the molecular and cellular mechanisms that drive HSC production and regulation.

We make extensive use of *in vitro* experiments where possible, which extensively reduces the animal numbers. The use of *in vitro* cultures/assays allows this project to comply with the 3Rs (replacement, reduction and refinement) by keeping the mice numbers to be used to a minimum. Indeed, our *in vitro* data, consisting of flow cytometry analysis and *in situ* hybridization experiments, have permitted to tremendously reduce our long list of potent HSC regulators to 20 (see Preliminary data in part 3.1)). Based on these data, available literature and interactions with other scientists, we will now study the functional role of these genes during endothelial specialization, endothelial into hematopoietic transition, pre-HSC maturation, HSC survival and/or expansion or involved in the supportive surrounding microenvironment. The functionality of these gene scan only be performed *in vivo* (in transplantation assays).

Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible.

Where possible, mice with inducible alleles will be used, so mice should not display a phenotype before the induction of the alleles.

Experiments will be done sequential, where on basis of the results, decisions will be made on the next steps.

If homozygous mice do not show any discomfort, we will keep the mice on a homozygous background, thereby reducing the number of mice.

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

The experiments in this project are not carried out due to legal requirements.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

of the Directive 2010/63/EU?

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

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

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

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

- Anaesthesia will be administered (by inhalation) in case of:

\* blood collection (at 1 and/or 4 months post transplantation) – Isofluraan (4%), in general.

\* to the pregnant females during all the intra-uterus transplantation procedure – Isofluraan (2-3%) , in general.

- Analgesia will be administered in case of pain (such as Rimadyl) to:

\* the transplanted mice

\* the pregnant females. One injection will be made once pre-operatively and repeated once 24 hours after surgery. The pregnant females will be checked regularly (until delivery) after in utero cell transplantation and also on the delivery day (and the following week). Pups should develop normally. If abnormality or discomfort is visible, the pups will be sacrificed by CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> followed by CO<sub>2</sub> inhalation. Animals will be sacrificed (and tissues collected) if unexpected illness occurs (by CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> followed by CO<sub>2</sub> inhalation).

- Parameters for health monitoring: Mice will be kept as groups. Food and antibiotic drinking water (such as neomycin) will be provided ad libitum. Animals will be monitored for health status (welzijnsdagboek) by the animal caretakers. Animals with a decreased health status (such as weight loss, bristly fur, bent back) will be checked by the researcher as well. In case of 15% loss of body weight within 2 days, the mice will be euthanized. In case of 20% loss of body weight compared to the littermates, the mice will be euthanized.

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

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

Other than in terminally anaesthetized animals dosing and sampling procedures will be undertaken using a combination of volumes, routes and frequencies that will result in no more than transient, light mild discomfort. In less than 3% of all experiments, pumps/pellets will be implanted which leads to a mild discomfort.

Due to administration of inducing agents or other substances, animals will be experiencing no follow up effects.

The scientific endpoints of all studies are much earlier than the humane endpoints.

It is not expected that the activation or inactivation of genes will lead to discomfort. However, it is impossible to predict the nature or severity of any potential genetic defect. So, in all cases, animals will be carefully monitored for possible side effects. Animals exhibiting any unexpected harmful phenotypes will be killed within a day and analysed.

Explain why these effects may emerge.

Mice might have sickness and/or disorientation signs after waking up from anesthesia and have some pain due to the surgery. Analgesia will be administered accordingly.

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

Monitoring of the mice combined with an experimental design aiming at reducing the discomfort of the animals. If we unexpectedly observed weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behavior or body posture, signs of general sickness and/or discomfort animals will be taken out of experiment and sacrificed.

#### **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.

Weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behaviour or body posture, and signs of general sickness and/or discomfort.

Indicate the likely incidence.

Expected <5%, moderate <1day.

#### **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').

Recipient pregnant females; n = 240 mice; Moderate  
Growing transplanted embryo recipients; n = 1440 mice; Mild  
Newborn recipients; n = 2268 mice; Mild  
Adult primary recipients; n = 1890 mice; Mild  
Adult secondary recipients; n = 126 mice; Mild  
Total = 5964 mice

- After irradiation: The animals might develop a decreased health status during the first month (loss of weight). Mild, 7-30 days, expected <10%.
- After transplantation in adult: Mice might be more sensitive to infections. Mild, 7-30 days, expected <10% (because of antibiotics in the drinking water).
- After in utero transplantation (because of the surgery): Moderate, 1 day, 100% animals
- Waking up from anaesthesia (after in utero transplantation, blood collection): Mice might have sickness and/or disorientation signs. Mild, < 1 day, expected 100%.
- Sacrifice: Mild, < 1 minute, 100% animals

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The animals need to be killed to collect embryos, cells or tissues and for ex vivo analysis.

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

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

Yes





## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 80100 - KNAW
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. [REDACTED]
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure   |
|---------------|--|
| 3.4.4.4       | Transplantation in Zebrafish, live imaging and ex vivo analysis. |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Wild type or genetically modified zebrafish will be used to study HSC production and regulation during embryonic development and in adult.

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

The zebrafish (as the mouse) is now firmly established as a reliable developmental and genetic model to study vertebrate hematopoiesis. To enable the study of HSC production and regulation in zebrafish, we will perform HSC manipulation into embryos (e.g. tamoxifen injection) and/or transplantation in adult recipient animals (hematopoietic mutant or wild type conditioned by gamma-irradiation ([REDACTED]) (see Flowchart C3). HSC transplantation will allow to study cell autonomy of mutant gene function and to rescue multi-lineage hematopoiesis in embryonic lethal mutants. Transplant recipients are anesthetized in tricaine (in general) and injected intra-cardiac by using glass capillary needles.

The transplanted adult animals (>3 months old) are visualized weekly under an inverted fluorescent microscope to monitor donor fluorescent cells over the first 30 days after transplantation. In some cases (analyze the function of specific genes), fish treated between 48-72 hours post fertilization with a tamoxifen injection will be grown to 5 months. They will be then subjected to split dose 30Gy irradiation and transplanted. This high dose of irradiation is provided to eliminate the hematopoietic cells of the fish recipient, which is necessary to allow the engraftment of the donor cells. The irradiation dose has been chosen based on the literature published by various laboratories

performing transplantation experiments in zebrafish.

At a chosen end point (depending of the research question, between 6 to 20 weeks post irradiation/transplantation), the animals will be anesthetized (in general) with 0.02% tricaine prior to collect the hematopoietic tissues for *ex vivo* analysis (e.g. histology, *in situ* hybridization, RNA/DNA isolation) (see Flowchart C4). Different *ex vivo* analysis techniques require different handling of the extracted tissue (e.g. cryo-sectioning or paraffin embedding). If possible the *ex vivo* techniques will be combined.

Some zebrafish embryo will also be used for time-lapse live confocal imaging. In our experience the imaging method [REDACTED] is the most reliable method. Direct visualization of fluorescent donor cells in embryonic recipients allows engraftment and homing events to be imaged in real time. These results provide a cellular context in which to study the genetics of hematopoiesis. During imaging, embryos are anaesthetized (in general) with 0.02% tricaine in embryo buffer. The imaging will be done once for each zebrafish embryo for up to 24h (age of embryos: below 5 days post fertilization (dpf) and, therefore, are no part of the licence project).

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

- It is our experience (in our institute and in the literature) that in general 16 (transplanted) adult animals are needed to collect tissues/cells (Flow chart C4) and 30 embryos for live confocal imaging per condition. These numbers are based on common scientific practice in our research field to allow publication.
- Different *ex vivo* analysis techniques require different handling of the extracted tissue (e.g. cryo-sectioning or paraffin embedding). To reduce the number of animals that are required we will combine *ex vivo* assays for different parameters as much as possible.

## **B. The animals**

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

### **Maximum of zebrafish: 4,992**

**Genders: both males and females will be used.**

To note, the number of experiments needed is based on your experience over the last years and my expectation that my workgroup has a rather stable number of experienced researchers involved.

- Zebrafish (*Danio rerio*) is one of the most well characterized fish. Zebrafish are well maintained and bred in a laboratory condition. Furthermore, the zebrafish model comes with numerous tools, which can be used to fully exploit its potential, including a fully annotated genome and efficient genome editing strategies.

- The zebrafish used here are bred [REDACTED].

- To test HSC engraftment or to test the effect of a treatment or genetic condition on HSC production a maximum of 16 animals (8 controls and 8 treated) are required for each type of analysis. To test HSC engraftment, the animals will be analysed at 1 time point (adult). To test the effect of a treatment or genetic condition, it will be required to analyse up to 3 time points (time point of HSC emergence in the embryo aorta, time point of HSC colonization/expansion in the embryo CHT, time point of colonization of adult hematopoietic organs). In all cases, we will measure up to 4 different *ex vivo* parameters (e.g. gene expression, lineage tracing, cell proliferation, cell apoptosis,) requiring different fixation and embedding techniques (See Flowchart C4).

Experiments will be performed on embryos and adults. However, experiments on zebrafish < 5 dpf is not considered as an animal experiment. Therefore, only the experiments on adult animals are part of the license and only these animals are counted. Therefore, we will use:

16 animals (8 controls and 8 treated) x 1 time point (adult) x 4 (*ex vivo* parameters) x 3 (experiments)  
= **192 fish**

It is expected that during the duration of this project we will test 25 genetically modified or knockout lines. Tissues and cells will be collected on all animals. Therefore we will use:

16 animals (8 controls and 8 treated) x 1 time point (adult) x 4 (*ex vivo* parameters) x 25 (genetically

modified or knockout lines) x 3 (experiments) = **4800 fish**

- Live confocal imaging will be performed on embryos (<5dpf and therefore no part of license project). It is our experience that 30 embryos per condition are needed to analyse EHT and HSC production. This embryo number is common scientific practice in the research field to achieve reliable and publishable results.

### 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.

- Replacement: HSC production needs to be studied *in vivo*. There are no *in vitro* models available to study HSC production. Zebrafish are easy to maintain in an animal facility and are a well-characterized model to study HSC production.
- Reduction: *Ex vivo* assays will be combined as much as possible to reduce the number of animals that are required. The experiments will be executed in a phased order so that follow up experiments are only executed when pilot experiments show a positive outcome.
- Refinement: Animals will be anaesthetized in general in Tricaine solution to reduce the discomfort of the treatment.

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

In order to minimize the animal suffering, all procedures to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects. Procedures will only be performed by competent personnel.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

The proposed procedures are for fundamental research. It does not consist of legally required research.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

The animals will be anaesthetized during transplantation with proper anaesthesia (in general with MS222 - Tricaine methanesulfonate, 0.02%). We do not expect stress and discomfort in animals during transplantation.

Anesthesia will also be performed (in general with 0.02% tricaine) before blood (obtained by cardiac puncture), kidney and spleen collection.

Transplanted recipients will be anesthetized in general in tricaine and immobilised in individual conical wells made in 2% agarose. Cells will be injected into the sinus venosus of the embryo at 48-72hpf or in adults. Recipients will be maintained in medium containing penicillin and streptomycin during and for several hours after transplantation to prevent infection.

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

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

No other adverse effects on the animals' welfare are expected.

Explain why these effects may emerge.

n.a.

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

### 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.

The animals will be checked daily for signs of general sickness and discomfort (e.g. laying on the bottom of the tank, rapid gill movements).

Indicate the likely incidence.

Expected in <1%; mild discomfort no longer than 1 day (due to the irradiation and transplantation).

### 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').

n = 4,992 zebrafish; Mild

Animals reaching the humane end-point will be euthanized.

---

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Transplanted zebrafish will be killed to collect hematopoietic tissues/cells for ex vivo analysis.

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.

Zebrafish will be killed by submersion in ice-cold water for at least 10 minutes. This procedure is currently common practice and is part of the guidelines by the Animal Research Advisory Committee (ARAC) of the NIH.

Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Kon. Ned. Academie van Wetenschappen (KNAW)

Postbus 19121

1000 GC AMSTERDAM



**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  
AVD8010020171047  
**Bijlagen**  
1

Datum 6 juni 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 17 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The cellular and molecular basis of the hematopoietic production" met aanvraagnummer AVD8010020171047. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 29 mei 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u gevraagd de dieren vanaf E18 op te nemen als proefdier, of beide geslachten dieren worden ingezet en of u de go/no go criteria meer kunt beschrijven. U heeft de documenten van uw projectaanvraag aangepast op basis van de antwoorden. Alleen bijlage dierproeven 3.4.4.1 is niet aangepast.

#### **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 "The cellular and molecular basis of the hematopoietic production" starten. De vergunning wordt afgegeven van 6 juni 2017 tot en met 1 juni 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-KNAW gevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 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:**

AVD8010020171047

### **Bezwaar**

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

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

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

### **Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

**Datum:**  
6 juni 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD8010020171047

  
H. G. de Putter  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

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





# Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

**Naam:** Kon. Ned. Academie van Wetenschappen  
(KNAW)  
**Adres:** Postbus 19121  
**Postcode en plaats:** 1000 GC AMSTERDAM  
**Deelnemersnummer:** 80100

deze projectvergunning voor het tijdvak 6 juni 2017 tot en met 1 juni 2022, voor het project "The cellular and molecular basis of the hematopoietic production" met aanvraagnummer AVD8010020171047, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-KNAW. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Groepsleider.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 17 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 29 mei 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 29 mei 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 17 mei 2017, ontvangen op 17 mei 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 29 mei 2017

**Aanvraagnummer:**  
AVD8010020171047

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1 Generation of new GMO (mice)</b>				
	Muizen (Mus musculus) /	3.000	100% Matig	
<b>3.4.4.2 Donor – Ex vivo analysis (mice, zebrafish)</b>				drachtige vrouwen n=2205, jonge dieren n=720, volwassen muizen n=126
	Muizen (Mus musculus) /	3.051	100% Licht	
<b>3.4.4.3 Recipient – Ex vivo analysis (Transplantation in pregnant females, newborns and adult mice)</b>				
	Muizen (Mus musculus) /	5.964	4% Matig 96% Licht	
<b>3.4.4.4 Transplantation in Zebrafish, live imaging and ex vivo analysis</b>				
	Zebravissen (Danio rerio) /	4.992	100% Licht	

**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.

**Aanvraagnummer:**  
AVD8010020171047

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



**Aanvraagnummer:**  
AVD8010020171047

## 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:**  
AVD8010020171047

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 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.

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** donderdag 8 juni 2017 9:16  
**Aan:** 'secretariaat DEC'  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: Beschikking AVD80100 2017 1047 > correctie aantallen gevraagd

Beste [REDACTED]

Dank voor uw bericht. Er is inderdaad sprake van een vergissing, onze excuses hiervoor. Een correctie van de beschikking wordt u later vandaag toegezonden,

Vriendelijke groet, [REDACTED]

Namens Centrale Commissie Dierproeven  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!) -----Oorspronkelijk bericht-----

Van: secretariaat DEC [<mailto:DECsecr@knaw.nl>]

Verzonden: woensdag 7 juni 2017 15:18

Aan: 'info@zbo-ccd.nl'

CC: [REDACTED]

Onderwerp: FW: Beschikking AVD80100 2017 1047 > correctie aantallen gevraagd

Geachte CCD,

We willen u graag bedanken voor de vlotte afhandeling van onze aanvraag en het sturen van de positieve beschikking over AVD80100 2017 1047.

Bij controle hebben we echter bemerkt dat er een fout in de tabel van de beschikking staat. Op verzoek van de CCD is een extra groep onder 3.4.4.2 toegevoegd van 378 E18 embryo's. Deze zijn echter niet in de beschikking opgenomen; bijgaande de naar u op 29 mei 2017 gestuurde tabel met in rood de aanpassingen. Wij gaan ervan uit dat het om een vergissing gaat.

Namens de onderzoeker en de IvD-HI wil ik vragen om de beschikking aan te passen en de 378 dieren toe te voegen.

Wij horen graag van u.

Met vriendelijke groeten,  
[REDACTED]  
[REDACTED]

[REDACTED]  
[REDACTED]  
Onderwerp: Beschikking 1047

Geachte [REDACTED],

Deze beschikking is ook per post verzonden.

Met vriendelijke groet,

Namens,

Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

Nationaal Comité advies dierproevenbeleid [www.ncadierproevenbeleid.nl](http://www.ncadierproevenbeleid.nl)

.....  
Bezuidenhoutseweg 73 | 2594 AC | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag  
.....

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Kon. Ned. Academie van Wetenschappen (KNAW)

Postbus 19121  
1000GC Amsterdam

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**  
AVD8010020171047

**Uw referentie**

**Bijlagen**  
geen

Datum 8 juni 2017

Betreft Correctie beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 17 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'The cellular and molecular basis of the hematopoietic production' met aanvraagnummer AVD8010020171047

### **Beslissing**

Op 6 juni 2017 hebben wij u de beschikking en vergunning van uw aanvraag toegezonden. Op 7 juni 2017 hebben de DEC en de verantwoordelijk onderzoeker contact met ons opgenomen, omdat het dieraantal voor bijlage 3.4.4.2 niet correct is. In de vergunning staan n=3051 genoemd, terwijl in de aanvraag n=3429 staat beschreven.

Zoals in de beschikkingsbrief van 6 juni 2017 genoemd, hebben wij uw aanvraag beoordeeld. Bij de beoordeling van uw aanvraag hebben wij het aantal dieren zoals genoemd in uw aanvraag meegenomen. De aan u verstuurd vergunning bevat dus een kennelijke verschrijving en kan gecorrigeerd worden naar n=3429 proefdieren voor bijlage 3.4.4.2 'donor- Ex vivo analysis (mice / zebrafish'.

Voor het overige blijft het besluit van 6 juni 2017 ongewijzigd. Deze brief dient u bij uw vergunning te voegen.

### **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 gegevens in het colofon.

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



**Datum**

8 juni 2017

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD8010020171047

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).

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

  
M. G. de Pater

Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

Inventaris Wob-verzoek W17-11										
nr.	document NTS 20171085	wordt verstrekt				weigeringsgronden				
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x			
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x		x			
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x			
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x			
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x		x			
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x		x			
8	DEC-advies				x		x			
9	Ontvangstbevestiging				x		x			
10	Verzoek om aanvullende informatie				x		x			
11	Adviesnota CCD		x							x
12	Beschikking en vergunning				x		x			



## Centrale Commissie Dierproeven

## 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](http://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 **10600**

Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

Naam instelling of organisatie **Universiteit Leiden**

Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde

KvK-nummer **27368929**

Straat en huisnummer **Rapenburg 70**

Postbus **9502**

Postcode en plaats **2300RA Leiden**

IBAN **NL78RAB00102468869**

Tenaamstelling van het rekeningnummer **Universiteit Leiden / Faculteit W&N**

- 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

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

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

(Titel) Naam en voorletters

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

(Titel) Naam en voorletters  
 Functie  
 Afdeling  
 Telefoonnummer  
 E-mailadres

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

Ja > Stuur dan het ingevulde formulier met bijlage 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 0 - 1 - 2017

Einddatum 31 - 12 - 2021

- 3.2 Wat is de titel van het project?

PCAD4Cod - Impact of seismic survey sound exposure on fish

- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Het effect van seismisch onderzoek op zoutwater-vissen

- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?

Naam DEC DEC Leiden

Postadres Postbus 9600  
2300 RC Leiden

E-mailadres

## 4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1684 Lege

Wijziging €            Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.

Via een eenmalige incasso

Na ontvangst van de factuur

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



## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

## 6 Ondertekening

6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam: 

Functie: 

Plaats: Leiden

Datum: 17-5-2017

Handtekening: 

*Faculteit Wetkunde en  
Natuurwetenschappen*



## Form Project proposal

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

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

#### Project background and stake holders

The proposed experiments concern the core investigations with living animals (marine fish) of a project that is funded by the [REDACTED], which supports

independent research to help increase understanding of the effect of sound on marine life generated by oil and gas exploration and production activity. Our research proposal and team was selected in an open competition of a global Request For Proposals, based on scientific content and expertise, respectively.

The target information and insights of the project are fundamental in nature, but also have applied value and are shaped by the explicit call from society. Our research and findings will play a critical role in legislation and authorization of noisy offshore activities and are thereby important for ecology and economy.

Before the current plans (Phase II), the JIP has also funded a one-year desk study (Phase I), which included several workshops in 2015 and 2016 with experts from all over the world. Phase I has led to a 95-page report on: "Population level consequences of seismic surveys on fish: *Knowledge gaps and research strategies*" (██████████ October 2016). The report is approved by the PCAD4Cod advisory board and the scientific board of the JIP.

### Noise pollution in an acoustic underwater world

The amount of marine anthropogenic noise has increased over the last decades, globally and in the North Sea. This has led to a growing concern about its effect on aquatic life including fish. The visibility in the aquatic environment is typically low, so fish make use of sounds for all kinds of activities including orientation, communication, predator avoidance and reproduction. Consequently, noise pollution may hinder, mask, disturb and deter, but we still have limited insight into potentially detrimental effects on individual fitness and population dynamics.

A potentially important anthropogenic sound source is the performance of marine seismic surveys. Seismic surveys are explorations of the geological structure beneath the seafloor, this includes the search to oil and gas resources. Marine seismic surveys are conducted using a vessel towing one or two arrays of airguns and one up to more than ten streamers of hydrophones (Slabbekoorn et al., 2010; Carroll et al., 2016).

The airguns (seismic sources) produce high intensity, low-frequency impulsive sounds at regular intervals (e.g. every 10 seconds, potentially for sequences of several hours and repeated for several days to weeks and even months). Most energy of the sounds produced by airguns falls within the 10 – 300Hz frequency range, which is within the sensitive hearing range of most – if not all – fish (Carroll et al., 2016).

The sound pulses of seismic surveys can affect fish in a multiple ways, this is highly depended on the distance of the fish from the seismic source. The sound pulses are so loud and the rise-time is so short that fish close to the source can suffer from physical injury and immediate death. The range in which physical injury poses a threat is however relatively small compared to the range in which the sound is audible and in which it might induce masking of biological relevant sounds and yield physiological and behavioural effects. These effects are more subtle but can affect many more individuals and species and are therefore more relevant for the consequences at population level (Popper et al., 2005; Slabbekoorn et al., 2010).

The majority of the studies on the effect and impact of seismic surveys on fish focussed on confined or caged fish, because tracking free-swimming fish involves observational challenges. Some papers describe reduced or increased catch rates after seismic surveys, underlying mechanisms are usually not clear but might involve energetic costs and opportunity loss in terms of feeding or spawning due to spatial deterrence, change in swimming depth, reduced foraging activity, and increased swimming activity.

To predict the consequences of anthropogenic noise on marine mammals 'Population Consequences of Acoustic Disturbance' (PCAD)-models have been developed (e.g. New et al., 2013). But little progress has been made on such models for fish. It is not the specific target of this project to make a PCAD-model for a fish species, but we used a PCAD-framework to design a set of experiments, complementary to various modelling activities, that ultimately will help to get insight in the population level consequences of seismic surveys on fish.

References:

**Carroll, A.G., Przeslawski, R., Duncan, A., Gunning, M., and Bruce, B.** (2016). "A critical review of

the potential impacts of marine seismic surveys on fish & invertebrates," *Mar. Pollut. Bull.*, **114**, 9–24. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.11.038

**Metcalfe, J.D., Wright, S., Tudorache, C., and Wilson, R.P.** (2016). "Recent advances in telemetry for estimating the energy metabolism of wild fishes," *J. Fish Biol.*, **88**, 284–297. doi:10.1111/jfb.12804

**Neo, Y.Y., Hubert, J., Bolle, L., Winter, H.V., ten Cate, C., and Slabbekoorn, H.** (2016). "Sound exposure changes European seabass behaviour in a large outdoor floating pen: Effects of temporal structure and a ramp-up procedure," *Environ. Pollut.*, **214**, 26–34. doi:10.1016/j.envpol.2016.03.075

**New, L.F., Moretti, D.J., Hooker, S.K., Costa, D.P., and Simmons, S.E.** (2013). "Using Energetic Models to Investigate the Survival and Reproduction of Beaked Whales (family Ziphiidae)," *PLoS One*, , doi: 10.1371/journal.pone.0068725. doi:10.1371/journal.pone.0068725

**Popper, A.N., Smith, M.E., Cott, P. A., Hanna, B.W., MacGillivray, A.O., Austin, M.E., and Mann, D.A.** (2005). "Effects of exposure to seismic airgun use on hearing of three fish species," *J. Acoust. Soc. Am.*, **117**, 3958. doi:10.1121/1.1904386

**Slabbekoorn, H., Bouton, N., van Opzeeland, I., Coers, A., ten Cate, C., and Popper, A.N.** (2010). "A noisy spring: The impact of globally rising underwater sound levels on fish," *Trends Ecol. Evol.*, **25**, 419–427. doi:10.1016/j.tree.2010.04.005

---

### 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?

---

#### Consequences of seismic surveys for fish

The main objective of this project is to gain insight in the consequences of seismic surveys for fish behaviour and physiology. Our sub-goals are gaining insight into the effects of seismic surveys on swimming patterns/spatial avoidance, foraging activity, habituation, energy metabolism and whether the effect of seismic surveys on fish can be reduced by adjusting temporal or spectral features of the procedure and sound source. We want to gain this insight by complementary studies in captivity (caged fish in an on-shore tank and in a floating pen) and in the wild (free-ranging fish in the North Sea).

The objective of this project can be achieved within the proposed time frame through our expertise and experience. All researchers and collaborators have ample experience working with fish, addressing questions related to bioacoustics and fish behaviour, in both indoor and outdoor conditions. All experiments will be conducted based on methods that are already applied in earlier experiments by at least one of the researchers or collaborators involved in this project. The research team is supported by an international advisory board, which includes global experts in all aspects of our studies.

---

### 3.3 Relevance

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

The impacts of human activities on aquatic animals have been a major concern to scientists, conservationists, fisheries, and policy makers, since poorly regulated but noisy marine exploitations may cause irreversible damage to the environment or fish stocks. This study will improve our understanding on the relationship between seismic surveys and behaviour and physiology of fish, which may lead us towards prediction tools for population consequences of aquatic noise pollution.




As sound may be responsible for changes in fish behaviour, species interactions and declines in fish stocks, with consequences for people in fisheries, the outcomes of the research will be of interest to several scientific fields (including behavioural biology, marine ecology, bioacoustics and conservation biology). However, the outcomes are critical to the offshore industries, which rely on the biological insights for project permits by European and American Law, as insights into detrimental effects or potential for mitigation are concerned essential for sustainable exploitation of marine resources.

---

### 3.4 Research strategy



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

Recognizing behaviour with accelerometers in captive fish monitored by video		We will 1) test telemetry tools (tags and accelerometers) and collect reference data in captive fish monitored by video to later interpret detailed fish behaviour in semi-captive and free-ranging conditions; 2) explore the temporal and spectral acoustic features, as well as exposure conditions, that are critical for acoustic response tendencies for fish in a floating pen (taking age and species into account); 3) test for effects of sound exposure on growth and stress physiology in floating pen conditions; and 4) investigate effects of a full seismic survey on tagged fish while free-ranging at sea. We will use Atlantic cod ( <i>Gadus morhua</i> ) as the model species throughout (in 1-4) and compare (sub-)adults (in 2) to juveniles and to other types of fish such as mackerel ( <i>Scomber scombrus</i> ) and sole ( <i>Solea solea</i> ).
Effects of acoustic variation on fish response to sound in a floating pen		
Sound exposure effects on fish growth and stress physiology in a floating pen		
Full seismic survey effects on tagged fish while free-ranging at sea		

### 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.

Recognizing behaviour with accelerometers in captive fish monitored by video (1): We will study a limited number of individual fish to link accelerometer (3d motion tracker) data of tagged cod to their behaviour (appendix 1). This study will be conducted in a large indoor, transparent fish tank so we can film the fish and link the behaviour with the accelerometer output. These results will provide fundamental insights into cod swimming patterns that can be linked to metabolic requirements and that will be used in the other studies with fish in the floating pen and in the wild, for which we will not have video images. Tags with accelerometers have only recently become commercially available and they provide opportunities to measure detailed movements, recognize specific behaviours such as foraging behaviour and swimming bursts and thereby estimate costs and benefits in terms of energy budget (Metcalfe et al., 2016).

Effects of acoustic variation on fish response to sound in a floating pen (2): We will do experiments in a floating pen in a harbour at the Oosterschelde, which we used before in 2014 and 2016 to study the effect of anthropogenic sounds on fish [REDACTED]. We will do different experiments in which we expose groups of (sub-)adult cod to a seismic sound source or artificial sound stimuli that deviate to a variable extent from the seismic pulse (appendix 2). To determine how fish respond to the sound exposures, we internally tag the group of fish with acoustic tags (to continuously determine their position in the net over time). During some of the experiments we will also internally tag them with the accelerometers. We will conduct 5 experiments in which we typically have 20 trials: 20 groups of 4 fish exposed to multiple sessions of (modified) seismic sounds.

Sound exposure effects on fish growth and stress physiology in a floating pen (3): We will use similar floating pens as in the acoustic response studies for a more long-term study to assess the effect from relatively long-term seismic airgun exposures on growth and physiology of cod (appendix 3). Fish will not have to be tagged for telemetry, but will remain for periods of several weeks in the harbor environment to get individual measures of changes in body size. They will only get a small personal identity tag under the skin. We will determine cortisol levels to assess base line conditions and test for acute and chronic elevations. There will be treatment fish exposed to noise pollution and control fish exposed to ambient conditions during the same periods in the water (which is possible because of the shallowness of the harbor, restricting high amplitudes to a relatively small zone around the sound source).

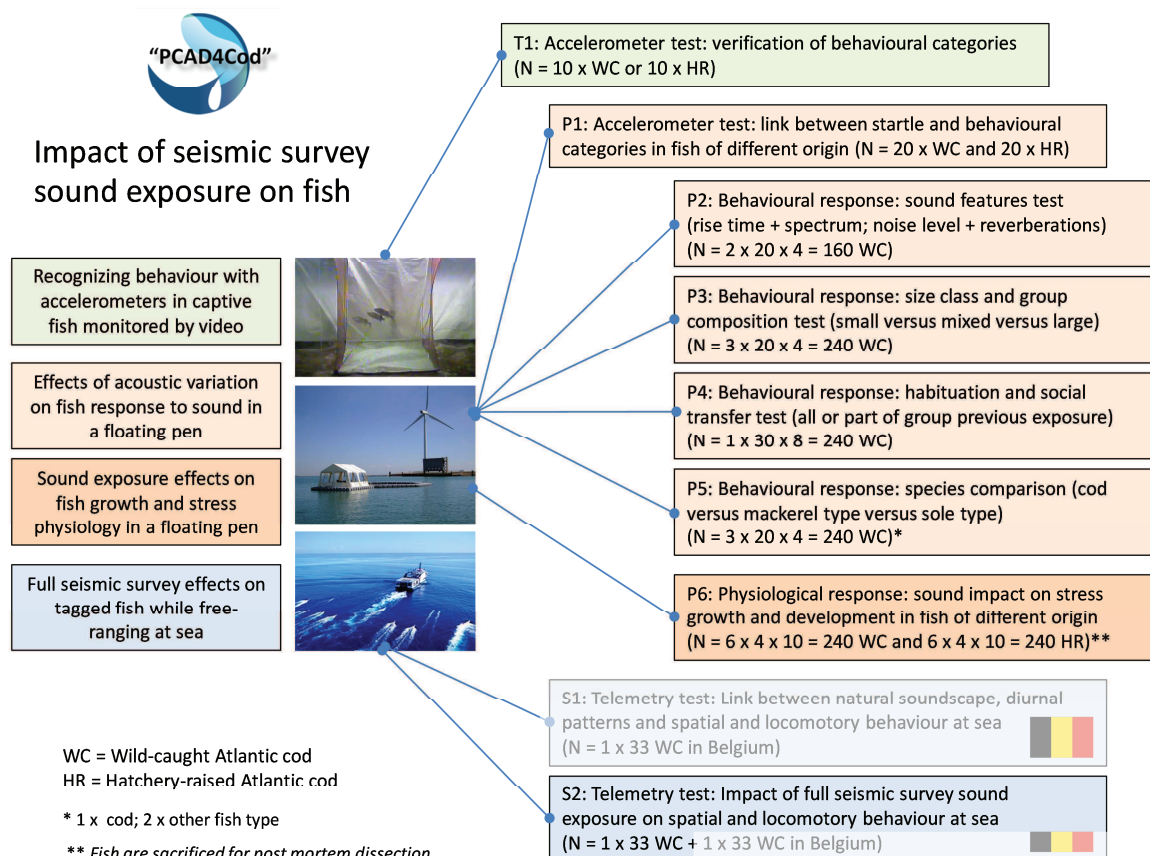
Full seismic survey effects on tagged fish while free-ranging at sea (4): We will do an experiment in the North sea, with wild, free ranging cod (appendix 4). We selected two sites (wind farms) in which we will tag cod with acoustic tags and accelerometers. These sites are in front of the Dutch and Belgian coast; very similar in ecology, distant enough to be acoustically independent, but close enough to have similar populations of cod and comparable weather conditions. Both sites are familiar to the research team and we have several years of experience with tagging cod at these sites. In 2017, we will conduct a small-

scale study in one site (Belgium) to fine-tune telemetry and accelerometer data collection (related to optimal set-up, preferred tag settings, technical procedures). In 2018, we will conduct the full seismic survey experiment: one of the sites will be exposed to a vessel with a full airgun array (Netherlands), the other site will serve as a control (Belgium). Detailed data on fish movements will be collected for several weeks before, several days during, and several weeks after the seismic exposure.

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.

All four components are part of the overall JIP-project and are complementary in gaining insight into the effects of seismic survey sound exposure on fish populations (see overview below). Additional parts to the project concerns detailed measurement and modeling of sound field conditions in all tests (fish tank, floating pen and the North Sea) and energy budget modeling based on input parameters from the field data on behavioural responsiveness, intensity and duration as well as on physiological response measures of growth and stress hormone levels. All parts are expected to be done and published within four years from the start of this project on the 1<sup>st</sup> of April 2017 (experiments only start after CCD-approval).

The first indoor experiment (T1) will yield data that will also be used to interpret (part of) the data from accelerometers in the other experiments. The semi-natural experiments provide data in a more natural sound field than in the indoor fish tank and of higher resolution than is possible at sea (P1-P5). The floating pen also makes it possible to catch fish quickly after exposures, which enables monitoring growth and stress physiology (P6), which is not feasible at sea. Large numbers of fish can be tested in the floating pen for relative response differences to a variety of seismic and other artificial sounds. Also size and species comparisons can be done in these semi-captive conditions. However, the response data for a large number of acoustic features, ambient conditions and fish categories will only be put in a realistic perspective by the response of free-ranging cod to an actual seismic survey (S1 and S2, note that S1 and half of S2 will be carried out in Belgium and are not an explicit part of this Dutch application).



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	Recognizing behaviour with accelerometers in captive fish monitored by video
2	Effects of acoustic variation on fish response to sound in a floating pen
3	Sound exposure effects on fish growth and stress physiology in a floating pen
4	Full seismic survey effects on tagged fish while free-ranging at sea
5	
6	
7	
8	
9	
10	

## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure   |
|---------------|--|
| 1             | Recognizing behaviour with accelerometers in captive fish monitored by video |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 2 Description of animal procedures

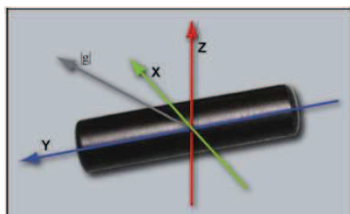
##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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



We here propose one experiment in which we will equip Atlantic cod with an accelerometer tags and record the cod on video to collect data on a variety of activities. We will provide multiple stimuli such as food and sound to gather data on movement characteristics related to feeding on particles in the water column or at the bottom and acoustically induced jerks or acceleration. We will also use this study to determine the recovery time of the tagging procedure.

In laboratory aquariums it is easy to video fish and thus to track and identify activities (Neo et al. 2015). However, the acoustic and behavioural validity is low in aquariums. The validity will be higher in outdoor settings, but there it is harder to get high-quality video on fish because of the low visibility underwater. A way to overcome this is to equip the fish with an acoustic tag that enables us to track the fish' position each second, in this way we can reconstruct swimming patterns but we cannot identify activities such as feeding or startle responses.



Previous work has shown, however, that data from accelerometer tags (motion trackers) can be used to identify activities (e.g. Broell e.a., 2013, see figure). To be able to identify specific categories of activities, we 'calibrate' the accelerometer-data by recording fish with accelerometers on video, in a fish tank with good visibility, and link activities to accelerometer data. This will yield reference data on movement patterns

and behavioural categories that we will use as reference in outside studies.

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

The fish will be caught in the North Sea from a research vessel using fishing rods. On the vessel, the fish will be kept in holding tanks, water in these tanks will regularly refreshed with North Sea water using a pump. After landing at the shore, the fish will be transported to the holding tanks at [REDACTED]. Here, the fish can recover and acclimatize for at least 3 weeks before being used in the experiment. Two days before tagging, the fish will be transferred to a separate tank in which its behaviour can and will be recorded on video.

Right before tagging, the fish will be transferred into an anaesthetics bath with 2-phenylethanol. Once anaesthetised, the fish will be implanted with an accelerometers tag in its abdominal cavity with an incision of 2 cm and sutures (fig. 1). The size-dependent selection of the tag will result in a tag that is less than 5% of the fish body weight, and is not expected to alter the swimming patterns of the fish. The process (anaesthesia and tagging) will take less than five minutes and the fish will start swimming again a few minutes after the surgery.

Right after the surgery, the fish will be transferred back into the tank in which the fish can be recorded on video. As in standard practice, no analgesics will be used after the surgical implantation. From our experience, fish do not show signs of pain after such minor surgeries. Research on analgesia in fish is still in its infancy and very little is known about the possibilities and consequences of its usage (Gräns et al., 2014; Sneddon, 2012; Stevens, 2008).

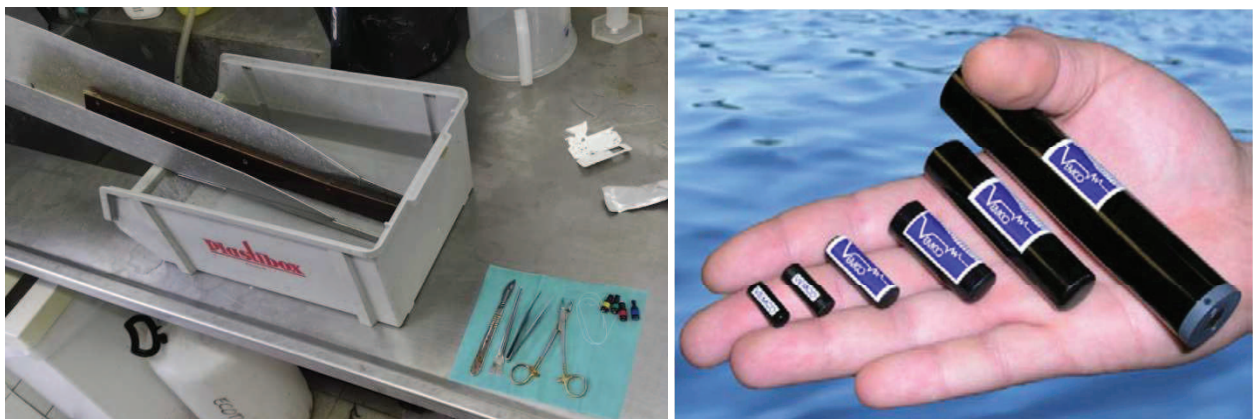


Figure 2: Tagging set-up at [REDACTED] (left) and tags of various sizes (right). The middle two classes are appropriate for our fish size classes.

We expect the fish behaviour to recover within two days (based on previous experiments that involved internal tagging in European seabass), but we will video the fish for a maximum of 5 days, and in this way assess the full recovery time. From day one, we will provide several food items to assess whether the fish resumes feeding and to track the behaviour with the accelerometers. On the last day we will playback several short sound stimuli to elicit startle responses to also track this with the accelerometers.

After the last video recording, the fish will be caught using a scoop net and its tag will be removed using a similar procedure as the tag implantation. The fish will be anaesthetised in a bath with 2-phenylethanol.

Once anaesthetised, the incision made for tag implantation will be opened again using an incision. Depending on whether the position of the tag inside has changed, the incision may be slightly bigger than the incision for tag implantation. We will remove the tag with tweezers. The process (anaesthesia and tagging) will take less than five minutes and the fish will start swimming again a few minutes after the surgery. The fish will be kept in a recovery tank for at least a week before being released in the wild again.

References:

- Gräns, A., Sandblom, E., Kiessling, A. and Axelsson, M.** (2014). Post-surgical analgesia in rainbow trout: Is reduced cardioventilatory activity a sign of improved animal welfare or the adverse effects of an opioid drug? *PLoS One* **9**.
- Sneddon, L. U.** (2012). Clinical Anesthesia and Analgesia in Fish. *J. Exot. Pet Med.* **21**, 32–43.
- Stevens, E. D.** (2008). " Pain " and analgesia in fish : What we know , what we do not know , and what we need to know , before using analgesics in fish. In *Conference: Blue sky to deep water: the reality and the promise. ANZCCART Proceedings, At Auckland, New Zealand*, pp. 115–124.

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

For this experiment, we need 10 Atlantic cod. The main goal of this study is to calibrate accelerometer tags, for this we do not just aim for significant differences within parameters, but we want to be able to identify and categorize activities. A similar study with great sculpins was done by Broell and colleagues (2013): for them 7 individuals were enough to calibrate the accelerometers resulting in near 80% correctly identified activities (at a 100hz sampling rate). We want to use 10 instead of 7 fish to be able to use the data from 3 individuals to test the calibration.

**Broell F., Noda T., Wright S., Domenici P., Steffensen J. F., Auclair J. P., Taggart C. T.** (2013) Accelerometer tags: detecting and identifying activities in fish and the effect of sampling frequency. *J. Exp. Biol.* **216**: 1255–1264.

## **B. The animals**

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

We will use Atlantic cod (*Gadus morhua*) caught in the North sea using fishing rods. We want to use wild-caught cod because they might exhibit more natural behaviour (than fish from a hatchery). This preference is a direct consequence of the explicit target to address potential effects on wild-ranging fish and to use complementary data to gain insight from floating pen and open water studies. We also use hatchery fish in other project components as we plan explicit comparisons between wild caught and hatchery raised fish. These comparisons will make a better link to the physiological studies that benefit from prior knowledge of age and background of individual fish (unavailable for wild caught fish) and are therefore including hatchery raised fish.

We will use fish of both sexes. The size will be dependent on what we will catch, but we aim for subadult fish of about 35-40 cm, but large variation in size is not a problem in an experiment like this and might even increase the validity of the results ( ). We only bring in healthy individuals from our fishing activities and do not expect any dropouts due to housing or handling procedures.

We chose to use Atlantic cod because it is an important and abundant fish species with a large distribution. Also accelerometer-data of cod have been correlated to energy metabolism (in prep), which means that we will be able to link our accelerometer-data to energy metabolism under seismic survey conditions. Furthermore, cod's hearing ability and ecology are generally similar to several other important commercial fishes, such as European seabass (*Dicentrarchus labrax*), haddock (*Melanogrammus aeglefinus*), whiting (*Merlangius merlangus*) and pollock (*Pollachius pollachius*).

We will use 10 individuals for this experiment.

## **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.

##### **Replacement**

The behaviour of fish can only be studied in a living specimen. Modelling is no option as species and size specific data are needed to interpret movement effects on accelerometer data to allow comparisons to field data on the complementary studies in the other appendices 2 and 4. Replacement is not possible.

##### **Reduction**

We use a limited amount of fish to achieve two goals (1. Link accelerometer data to behaviour; 2. Study the recovery after tagging).

##### **Refinement**

We have chosen to use Atlantic cod for this project. This species is known to do well in captivity and thanks to a partnership with ██████████, we can make use of specialized facilities to keep the fish until the start of the experiment.

We use an experimental set-up that has yielded valuable results in previous years. Throughout the years, the set-up has been refined. Our experience with this effective set-up ensures that unnecessary animal suffering can be avoided.

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

##### **1) animal suffering, pain or fear**

The aim of this study is to investigate behavioural categories and recovery after tagging in fish. Great care on the handling of fish to minimise stress is crucial in obtaining our objective. During the tagging process, 2-phenylethanol will be used as anesthesia to reduce mobility, sensory input and pain. The process is quick and the fish are expected to recover quickly after the procedure. We also allow ample time for the fish to recover from tagging and acclimatise to their new environment.

##### **2) adverse effects on the environment**

The experiment is conducted in a fish tank with fresh salt water directly from the nearby source (Oosterschelde). Water circulation and refreshment does not involve any chemical additives and therefore no adverse effects on the environment are to be expected.

### **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.

We have done an extensive review of the literature on the use of accelerometers in fish research. Also, we are being advised by – and collaborate with - fellow experts from all over the world and we visit conferences on topics that relate to these proposed studies. We think that there is an urgent need to do studies that ultimately give new and critical insight into population consequences of seismic surveys.

### **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.

The animal procedures will be carried out [REDACTED] is specialised in applied research regarding marine aquaculture and ecology.

The fish will be kept in holding tanks of 14.4 m<sup>3</sup> which fits a maximum of 120 individuals. The stock and experimental fish tanks will have a sandy bottom and the water will be continuously refreshed with fresh seawater from the Oosterschelde. In this way, we ensure that water quality and temperature are similar to the natural environment of cod.

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

[REDACTED] offers excellent research facilities for the housing, maintenance and care of different North Sea fish species. It is right next to our field site, making the transfer of fish between holding tanks and outdoor experimental pen very quick, thus minimizing transfer stress experienced by the fish.

## 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.

Prior to the tagging procedure, the fish will be put into an anesthetic bath of 2-phenylethanol solution. 2-phenylethanol is known to be an effective anesthesia for fish with a short recovery time. As in standard practice, no analgesic is necessary after surgery implantation on fish as fish do not show signs of pain after the procedures (Stevens, 2008).

Reference:

**Gräns, A., Sandblom, E., Kiessling, A. and Axelsson, M.** (2014). Post-surgical analgesia in rainbow trout: Is reduced cardioventilatory activity a sign of improved animal welfare or the adverse effects of an opioid drug? *PLoS One* **9**,.

**Sneddon, L. U.** (2012). Clinical Anesthesia and Analgesia in Fish. *J. Exot. Pet Med.* **21**, 32–43.

**Stevens, E. D.** (2008). " Pain " and analgesia in fish : What we know , what we do not know , and what we need to know , before using analgesics in fish. In *Conference: Blue sky to deep water: the reality and the promise. ANZCCART Proceedings, At Auckland, New Zealand*, pp. 115–124.



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

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

Since the fish will be kept in tanks with re-circulating water from the sea, there is a potential that the fish may be infected by infectious diseases from seawater. The risk will be highest after tagging.

Explain why these effects may emerge.

For tagging we need to make an incision which we make the fish more viable for infectious diseases.

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

We think we can decrease the likelihood to a minimum by only tagging fish that have good health and body condition. Also, we will prevent any water from entering the incision because the abdomen will be above water during the surgery. Fish housing facilities are provided by [REDACTED], who is very experienced in aquaculture and marine research.

### **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.

If there is visual evidence for lasting, abnormal behaviour, obvious disease or physical disorder, such as patches of scale loss and red or white spots, the fish will be euthanized with a percussive blow to the head to free them from any unnecessary suffering.

Indicate the likely incidence.

Stress caused by the transport from hatchery and potential infections. Based on our previous experiments, we expect very little likelihood that these occur.

### **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').

Fish catching (at the North Sea) and transferring - mild

Surgical implantation of tag - moderate

Various food stimuli - none

Sound stimuli - mild

Surgical removal of tag - moderate

Overall - moderate

## **End of experiment**

### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

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

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

Yes

## Appendix

### Description animal procedures

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

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10600
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Leiden University
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure  |
|---------------|---|
| 2             | Effects of acoustic variation on fish response to sound in a floating pen |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

### 2 Description of animal procedures

#### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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



To examine the effects of seismic surveys on fish, we will expose Atlantic cod to sound sources (scaled air gun and/or underwater speaker) in an outdoor net pen. We will identify behaviour and position via telemetry and accelerometry (follow-up from previous indoor test); test response variation to acoustic variation; explore influence of fish size and group composition; and test habituation and effects of previous experience by all or part of the fish. We will also compare cod with two other fish types, such as mackerel and sole.

The behaviour of the fish in all behavioural tests will be tracked using 3D acoustic telemetry and in some tests also accelerometers (for the latter, we use the results from appendix 1). The telemetry will provide data on the swimming activity of the fish, from which we can quantify changes and recovery in swimming depth, swimming speed, group cohesion and spatial avoidance. The accelerometers will provide data about the detailed motion patterns of the fish, which will yield insight into their energy metabolism and enables the identification of more complex behaviours like foraging (see appendix 1). All parameters will help us to gain insight into the effect of seismic sources on fish.

P1: Accelerometer test: link between startle and behavioural categories in fish of different origin (N = 20 x WC and 20 x HR)

P2: Behavioural response: sound features test (rise time + spectrum; noise level + reverberations) (N = 2 x 20 x 4 = 160 WC)

P3: Behavioural response: size class and group composition test (small versus mixed versus large) (N = 3 x 20 x 4 = 240 WC)

P4: Behavioural response: habituation and social transfer test (all or part of group previous exposure) (N = 1 x 30 x 8 = 240 WC)

P5: Behavioural response: species comparison (cod versus mackerel type versus sole type) (N = 3 x 20 x 4 = 240 WC)

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

All fish will be caught in the North Sea from a research vessel using fishing rods. On the vessel, the fish will be kept in holding tanks, water in these tanks will regularly refreshed with North Sea water using a pump. After landing at the shore, the fish will be transported to the holding tanks at [REDACTED]. Here, the fish can recover and acclimatize for at least 3 weeks before being used in the experiments.

In total, we want to conduct 5 different experiments in the outdoor net-pen, that follow a similar design, but differ in (sound) stimuli, amount of sound exposures or species. The experiments sometimes require a different number of animals (table 1) and the fish will be equipped with either only an acoustic tags or both an acoustic and an accelerometer tag.

### **Tagging**

Before any of the experiments can start, the animals need to be tagged. To do so, the fish will be transferred into an anesthetic bath with 2-phenylethanol. Once anesthetised, the fish will be implanted with a small acoustic tag (volume: 1.4 cm<sup>3</sup>; weight: 4.6 g; Model 795-LG, HTI Inc, US) and/or a tag with accelerometers (fish size dependent, < 5 % of the body weight) in its abdominal cavity with an incision of 2 cm and sutures. Note that we will make sure that the total weight of both tag(s) will be less than 5% of the fish weight, and that they are not expected to alter the swimming of the fish.

The process (anesthesia and tagging) will take less than five minutes and the fish will start swimming again a few minutes after the surgery. After this, they will be placed in a recovery tank for at least two days before being transferred to the outdoor floating pen, where the experiments take place. Although we expect the fish behaviour to recover within two days (based on previous experiments that involved internal tagging in European seabass), we will examine twice a day for stress-related behaviours, such as freezing and bottom-swimming, to see if a longer period is needed for cod. The fish will only be used for experiments when they have resumed their normal swimming behaviour without signs of discomfort.

As in standard practice, no analgesics will be used after the surgical implantation. From our experience, fish do not show signs of pain after such minor surgeries. Research on analgesia in fish is still in its infancy and very little is known about the possibilities and consequences of its usage (Gräns et al., 2014; Sneddon, 2012; Stevens, 2008).

### **Experimental design**

At the start of each experiment, the fish will be transferred to the floating pen in an artificial cove in the Oosterschelde. This cove ([REDACTED], fig. 1) is situated right next to [REDACTED]. After transfer to the floating pen (fig. 2), the fish will be allowed to acclimatise to the new environment for at least eight hours, before being exposed to sound of a seismic source or sound from an underwater speaker.

Data will be collected on swimming activity via the sound emitting tags. Using the acoustic tags, we can determine the position of all individuals every second. From these data, we can derive the swimming speed, swimming depth, group cohesion and distance from the sound source. Using accelerometer tags we can identify startle responses, feeding behaviour, lateral rotations, overall dynamic body acceleration and tail-beat frequency. The latter two will give insight into potential impact on the energy metabolism of the fish. We will use a before-during-after treatment design.

We will treat levels, of all of the above mentioned behavioural response parameters, 'before' the treatment as baseline behaviour and we will compare these levels for periods 'during' and 'after' the treatment (within-subject comparisons). This before-during-after design also enables us to determine recovery within a trial and reduced responsiveness between trials (habituation), by calculating how long it takes till certain levels return to baseline levels ([REDACTED]). This has proven to be a useful measure to compare different treatments (like we will do in experiment 2) and likely also to compare different life stages (as in experiment 3).

exposure changes European seabass behaviour in a large outdoor floating pen: Effects of temporal structure and a ramp-up procedure,” *Environ. Pollut.*, **214**: 26–34. doi:10.1016/j.envpol.2016.03.075 [REDACTED] (2016). Swimming bass under pounding bass. Fish response to sound exposure. PhD-thesis Leiden University.



Figure 1: The [REDACTED] with the floating pen



Figure 2: Floating pen and office tent

*Experiment P1: Accelerometer test: identification of behavioural categories in fish of different origin*

In this experiment we want to gain insight into the behavioural response of Atlantic cod on single airgun exposures. We will equip the cod with acoustic tags to determine their swimming patterns and also equip them with accelerometers to gain insight in more complex behaviours such as foraging. We will expose the cod to two periods of sound exposures per day for two days (two days extension period possible if more replication of behavioural categories per individual are needed), a single exposure takes 30-60 minutes. Also, if necessary on top of natural availability, we will add food stimuli to identify additional behavioural categories and to assess the effect of airgun exposures on feeding behaviour. We will compare 20 individuals that are wild-caught and 20 hatchery-raised cod.

*Experiment P2: Behavioural response: sound features test*

In this experiment we plan to play back sounds that reflect seismic survey conditions at various distances from the source by modifying some of the acoustic parameters. In this way, we will gain insight into when and why fish may be affected and whether it is possible to decrease effects on cod behaviour. We will use 2 x 20 groups of 4 individuals (Atlantic cod) and the fish will be equipped with both acoustic and accelerometer tags. The groups will be exposed to two sound treatments of 30 – 60 minutes per day, for two days. One series of 20 groups will focus on the effect on response from rise time and spectrum, the other series will focus on noise level (ambient conditions as background to seismic pulse) and reverberations (accumulating echoes with distance).

*Experiment P3: Behavioural response: size class and group composition test*

Noise impact studies – including the other experiments in this appendix - are usually (highly) controlled and therefore use uniform (groups of) subjects. However it might be that cod of different life stages (sizes) respond different to sound exposures. This is also important for determining population consequences. Because of that, we will compare the responses of two life stages (sizes) of Atlantic cod to seismic airgun exposures. We will compare the two life stages via 20 groups each with 4 individuals. In addition, to test whether size classes affect each other in mixed composition groups, we will have another 20 groups of 4 fish in which 2 are small and 2 are large. The fish will only be equipped with acoustic tags because we have calibrated the accelerometers for a single life stage (see appendix 1) and two tags might be too much for small fish. All groups will be exposed again to two sound treatments of 30 – 60 minutes per day, for two days.

*Experiment P4: Behavioural response: habituation and social transfer test*

It might be that cod initially respond strongly but that they habituate over time. This is highly relevant because seismic surveys in a specific area can take months and continue with pulse sequences that are hours long. We want to gain insight into short- and long-term habituation (intra- and inter-trial recovery) and into a phenomenon labelled as social transfer: experienced fish may transfer their response tendency to naïve fish. We will therefore test 3 x 10 groups of 8 fish. The first 10 will all 8 be in the floating pen for two days of repeated exposure. The second group will have 4 fish exposed to repeated sequences on day 1 and 4 naïve fish will join for exposures on day 2. The third group will have all fish in on day 1, but without exposure, making them all naïve to repeated exposure on day 2. Repeated exposure will include a maximum of 8 half-hour periods per day for two days.

*Experiment P5: Behavioural response: species comparison (cod versus mackerel type versus sole type)*

This project mainly focusses on cod as the prime model species, but we also want to explore to what extent the effects of seismic surveys on cod are comparable to the effects of seismic surveys on other abundant fish species in the North Sea. For that reason, we want to make a species comparison among cod, mackerel and sole as representatives of benthopelagic (living close to the bottom), pelagic (living across the water column) and benthic fish (living at or in the bottom). We will test again 20 groups with 4 individuals for all three species (in total 60 groups), they will be exposed to airguns for 30-60 minutes only once. The fish will be equipped with an acoustic tag. As this study includes a species that makes

explicit use of a sandy bottom, we will adjust our test conditions to have a few centimeters of sand on a bottom plate for the fish to lay down and to cover themselves.

Table 1: Summary of the behavioural experiments (P1-P5) planned for a period of four years. WC=wild-caught; HR=hatchery-raised.

Experiment	Individuals + origin (WC/HR)	Tags (acoustic/accelerometer)	Number of exposure days
P1 behaviours	20WC + 20HR = 40	Both	2-4
P2 sound features	2 x 20 x 4 = 160WC	Both	2
P3 size classes	3 x 20 x 4 = 240WC	Acoustic tag only	2
P4 habituation	3 x 10 x 8 = 240WC	Acoustic tag only	2
P5 species comparison	3 x 20 x 4 = 240WC	Acoustic tag only	2
Total:	900WC + 20HR		

After the last trial, the fish will be caught using a scoop net and its tag will be removed using a similar procedure as the tag implantation. The fish will be anaesthetised in a bath with 2-phenylethanol. Once anaesthetised, the incision made for tag implantation will be opened again using an incision, depending on the position of the tag we might have to make the incision slightly bigger than for implantation. We will remove the tag with tweezers. The process (anesthesia and tagging) will take less than five minutes and the fish will start swimming again a few minutes after the surgery. The fish will be kept in a recovery tank for at least a week before being released in the wild again.

#### References:

- Gräns, A., Sandblom, E., Kiessling, A. and Axelsson, M.** (2014). Post-surgical analgesia in rainbow trout: Is reduced cardioventilatory activity a sign of improved animal welfare or the adverse effects of an opioid drug? *PLoS One* **9**,.
- Sneddon, L. U.** (2012). Clinical Anesthesia and Analgesia in Fish. *J. Exot. Pet Med.* **21**, 32–43.
- Stevens, E. D.** (2008). " Pain " and analgesia in fish : What we know , what we do not know , and what we need to know , before using analgesics in fish. In *Conference: Blue sky to deep water: the reality and the promise. ANZCCART Proceedings, At Auckland, New Zealand*, pp. 115–124.

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

We study fish in groups because cod are social (shoaling) species that show natural behaviour only in groups. Moreover, some behavioural changes of interest, such as group cohesion (inter-individual distance) can only be studied in groups. The choice of four fish is based on minimising fish number while maintaining natural group dynamics. See table 1 for the number of fish that is needed for this experiment, in total 920 fish from which 740 Atlantic cod, and two other fish species with both 80 individuals. We typically use 20 groups as our replication sample (per experimental group i.e. life stage or species), this is slightly more than in our previous experiments using the same set-up. Reason for this is that the variation was slightly higher than expected based on indoor experiments. The number of 20 groups was determined using a one-sided t-test power analysis that was executed in R using the package *pwr*. We set the statistical power at 80% and p-value at 0.05, and expecting a difference of 0.2 m (primary parameter of interest: swimming depth) with a standard deviation of 0.34 m.

## B. The animals

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

We will use Atlantic cod (*Gadus morhua*) as our prime model species. We will catch the cod in the North Sea using fishing rods. We want to use wild-caught cod because they might exhibit more natural behaviour (than fish from a hatchery). We also plan to test hatchery-raised cod for some comparisons on behaviour. We will use fish of both sexes. The size and variation in size will depend on what we will catch, but we aim for subadult fish of about 35-40 cm. For the life-stage comparison in experiment 3 of this appendix, we will aim for a group of fish of about 25-30 cm and a group of 45-50 cm. We chose to use Atlantic cod because it is an important and abundant fish species with a large distribution. Also accelerometer-data of cod have been correlated to energy metabolism, meaning that

our accelerometer-data will also yield insight into energy metabolism under seismic survey conditions. Furthermore, cod's hearing ability and ecology are relatively well-studied and generally similar to several other species, many of which are important commercial fishes, such as European seabass (*Dicentrarchus labrax*), haddock (*Melanogrammus aeglefinus*), whiting (*Merlangius merlangus*) and pollock (*Pollachius pollachius*). At last, several cod stock populations collapsed in the 1990's, many others are at risk and therefore industries will be interested to gain insight in the effects of seismic surveys on cod.

In experiment 5 of this appendix, we also want to use two other fish species. In this way we can compare cod as benthopelagic (mainly inhabiting water just above the sea bottom) with fish of more pelagic and more benthic life styles.

For the number of individuals, see table 1 in section A.

### 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.

#### Replacement

The behaviour of fish can only be studied in living specimens. Relative response to acoustic stimuli is not well-known enough to be able to study using modelling. A replacement is not possible.

#### Reduction

By exposing the fish to a series of multiple treatments without incurring additional harm, we reduce the number of fish while obtaining maximal research gain. Moreover, we choose a minimum group size of four where fish can still show natural aggregational behaviour. A further reduction in the number of animals is not possible.

#### Refinement

We have chosen fish that are known to be able to live in captivity and thanks to a partnership with [REDACTED], we can make use of specialized facilities to keep the fish until the start of the experiment. We use an experimental set-up that has yielded valuable results in previous years. Throughout the years, the set-up has been continually refined. Our experience with this effective set-up ensures that unnecessary animal suffering can be avoided.

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

#### 1) animal suffering, pain or fear

The aim of this project is to investigate how sound stimuli causes stress and behavioural changes in fish. Great care on the handling of fish to minimise stress is inherently crucial in obtaining our objective. During the tagging process, 2-phenylethanol will be used as anesthesia to reduce mobility, sensory input and pain. The process is quick and the fish are expected to recover quickly after the procedure. We also allow ample of time for fish to recover from tagging and acclimatise to their new environment.

#### 2) adverse effects on the environment

The sound levels that we expose in the floating pen are not high enough to cause tissue injuries or

hearing loss. Although the sound itself may be heard by nearby aquatic animals, they may swim away from the sound temporarily to avoid auditory masking or physiological effects. We expect to aquatic animals to resume their distribution and normal behaviour either during or right after the sound exposure.

## 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.

We made an extensive literature review on research that has been done on the effects of seismic surveys of fish. Also, we are being advised by fellow experts from over the world and we visit conferences on topics that relate to these proposed studies. We think that there is an urgent need to do studies that ultimately give insight in population consequences of seismic surveys.

## 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.

The animal procedures will be carried out at [REDACTED] research institute at [REDACTED] in [REDACTED] is specialised in applied research regarding marine aquaculture and ecology.

The fish will be kept in holding tanks of 14.4 m<sup>3</sup> with maximum 120 individuals. The basins will have a sand bottom and the water is continuously refreshed with seawater from the Oosterschelde. In this way, we ensure that waterquality and temperature are similar to the natural environment of cod.

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

[REDACTED] offers excellent research facilities for the housing, maintenance and care of different North Sea fish species. It is right next to our field site, making the transfer of fish between holding tanks and outdoor experimental pen very quick, thus minimizing transfer stress experienced by fish.

## 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.

Prior to the tagging procedure, the fish will be put into an anesthetic bath of 2-phenylethanol solution. 2-phenylethanol is known to be an effective anesthesia for fish with a short recovery time. As in standard practice, no analgesic is necessary after surgery implantation on fish as fish do not show signs of pain after the procedures (Stevens, 2008).

Reference:

**Gräns, A., Sandblom, E., Kiessling, A. and Axelsson, M.** (2014). Post-surgical analgesia in rainbow trout: Is reduced cardioventilatory activity a sign of improved animal welfare or the adverse effects of an opioid drug? *PLoS One* **9**,

**Sneddon, L. U.** (2012). Clinical Anesthesia and Analgesia in Fish. *J. Exot. Pet Med.* **21**, 32–43.

**Stevens, E. D.** (2008). " Pain " and analgesia in fish : What we know , what we do not know , and what we need to know , before using analgesics in fish. In *Conference: Blue sky to deep water: the reality and the promise. ANZCCART Proceedings, At Auckland, New Zealand*, pp. 115–124.

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

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

Since the fish will be kept in tanks with re-circulating water from the sea, there is a potential that the fish may be infected by parasites or bacteria from seawater. The risk will be highest after tagging.

Explain why these effects may emerge.

For tagging we need to make an incision which we make the fish more viable for infectious diseases.

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

We think we can decrease the likelihood to a minimum by only tagging fish with a very good health and condition. Also, we will prevent any water from entering the incision because the abdomen will be above water during the surgery. To prevent water from entering the incision after stitching the incision, we will add some surgical/tissue glue on top the incision.

Fish housing facilities are provided by [REDACTED], who is very experienced in aquaculture and marine research.

### **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.

If there is visual evidence of consistent abnormal behaviour, disease, physical disorder such as patches of scale loss and red or white spots, the fish will be euthanized with percussive blow to the head to free them from any unnecessary suffering.

Indicate the likely incidence.

Stress caused by the transport from hatchery and potential infections. Based on our previous experiments, we expect very little likelihood that these occur.

### **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').

Fish catching (at the North sea) and transferring - mild

Catching and fish transfer from maintenance tank to outdoor pen - mild

Surgical implantation of acoustic tag - moderate

Sound exposure - mild

Surgical removal of tag - moderate

Overall - moderate

**End of experiment**

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Only the 20 hatchery-reared fish will be sacrificed after the procedures because we cannot release them in the wild and we do not have facilities to keep them. The 900 wild-caught cod will be released into the wild.

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.

X Yes

## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure  |
|---------------|---|
| 3             | Sound exposure effects on fish growth and stress physiology in a floating pen |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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



We want to study the effect of long-term sounds exposures to growth and stress levels in cod. To do this we will keep groups of cod in floating pens, either in noisy conditions or in ambient control conditions, for a time period of 6 weeks. Long-term anthropogenic noise including sounds from airguns might induce increased stress levels, disrupt foraging, decrease feeding success, and increase energy metabolism. This might accumulate to a reduction of growth and a decreased immune response.

The noisy conditions will be created using a single airgun or an artificial sound source that is able to mimic and vary seismic exposure features. We will weigh and measure the fish before and after the 6-week period. We will also measure stress hormone levels (cortisol) in blood samples before and after the end of this period. After the exposure period, we will sacrifice these fish to assess body condition (fat ratio) and maturation (gonad development).

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

Half of the fish will be caught in the North Sea from a research vessel using fishing rods and half of the fish fish will be delivered as a batch from a foreign hatchery. The fish will be kept in holding tanks and transported within hours to the facilities of [REDACTED]. Here, the fish can recover in a continuous flow-through system of natural sea water and acclimatize to captivity for at least 3 weeks before being used in the experiment. Each fish will be used in only one experiment and be part of either

treatment or control group.

### Experimental design

Each experimental round consists of 4 groups with 10 fish (see 2x2 design), of which 2 are treatment groups (seismic sound exposure) and 2 are control (ambient noise) and 2 are wild-caught (treatment and control) and 2 hatchery-raised (again one treatment and one control). At the start of each experiment, the four groups of fish will be implanted with a PIT tag and transported to the outdoor floating pens. The pens are located inside an artificial cove in the Oosterschelde, this cove ( ) is situated right next to . The very shallow nature of the cove enables us to make a noisy and quiet area within the same cove (the low frequencies audible to fish have long wave lengths and just do not transmit across the cove from experimental to control site).

	Wild-caught	Hatchery
Treatment	WT	HT
Control	WC	HC

Before the fish are placed inside the outdoor net-pens, they will be individually weighted and measured (length and body condition). This procedure will be repeated for each individual fish at the end of the study period. We will also implant the fish with a PIT tag, this is a very small transponder (well below 1 grams) that allows individual recognition. We will implant it with an injection needle in the dorsal muscle.

After transfer, the fish will acclimatise to the new outside environment for at least two days, after that we will catch the fish to collect blood samples from the tail vein to determine baseline levels of cortisol. We will wait another two days to allow recovery and then expose two of the four groups to sound from a seismic source/speaker for 30-60 minutes. Right after the first exposure we will collect another blood sample to determine the short time response in stress (cortisol) level. After that we will continue exposing half of the groups to sound from a seismic source/speaker twice per day for maximum 6 weeks. After the last trial we will again catch the fish and collect another blood sample to determine the long-term stress levels. Also, all fish will be sacrificed by a percussive blow on the head. This enables us to sample the muscles (for fat ratio) and gonads (for gonad development). This experimental design will be repeated 6 times, every time using 4 new groups of fish, the locations will be swapped to control for position of the pens and the interaction between position and time of the year.

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

We will use a total 24 groups of cod (total 240 individuals), 12 groups per treatment. In this way we will be able to detect a significant difference in growth of the group-means if the growth between groups differs for more than 10% and has a standard deviation of less than 10% of the growth. This is based on a power analysis executed using R and the package pwr, with a statistical power of 80% and a p-value at 0.05.

### B. The animals

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

We will use Atlantic cod (*Gadus morhua*), both wild-caught in coastal area of the North Sea as raised at a hatchery. We want to use wild-caught cod because they are the explicit target model for which we aim to get a better understanding. They might exhibit more natural behaviour and may have a different

physiology to some extent from hatchery-raised fish. We also want to use hatchery-raised fish as they provide the opportunity to have a homogenous group of known age and background, which is critical for measures of development. The replication with both wild-caught and hatchery-raised fish will yield complementary data and added value for interpreting studies on captive and/or hatchery-raised fish in general.

We will catch the North sea cod using fishing rods as this yields the least physical damage to the fish and is the best technique to collect fish that are healthy and still in good condition after capture and transport. Hatchery-raised cod will be ordered from a foreign company as there are no hatcheries in the Netherlands (details of the selected company will be shared before buying). We chose to use Atlantic cod because it is an important and abundant fish species with a large distribution. Furthermore, cod hearing ability and ecology are relatively well known and similar to several important commercial fishes, such as European seabass (*Dicentrarchus labrax*), haddock (*Melanogrammus aeglefinus*), whiting (*Merlangius merlangus*) and pollock (*Pollachius pollachius*). At last, several cod stock populations collapsed in the 1990's, many others are at risk and therefore off-shore industry and fisheries should be interested in the effects of seismic surveys on cod.

In total we will use 240 cod; 120 hatchery reared and 120 wild caught fish.

### 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.

#### Replacement

Fish physiology in response to sound exposures can only be studied in living specimens. Relative response to acoustic stimuli is not well-known enough to be able to study using modelling. A replacement is not possible.

#### Reduction

We did a power analysis to determine the minimum amount of fish needed for this experiment. We will tag the fish with PIT tags to be able to use parametric tests and reduce the amount of fish needed. Expected differences in growth and standard deviation are based on experiments in which the effect of sound from filters was assessed.

#### Refinement

We have chosen the Atlantic cod. This fish species is known to do well in captivity and thanks to a partnership with [REDACTED], we can make use of specialized facilities to keep the fish under optimal conditions until the start of the experiment. We will use an experimental set-up that has yielded valuable results in behavioural studies in previous years. Throughout the years, the set-up has been continually refined. Our experience with this effective set-up ensures that unnecessary animal suffering can be avoided.

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

#### 1) animal suffering, pain or fear

The aim of this project is to investigate how sound stimuli causes stress and physiological changes in fish. Great care on the handling of fish to minimise stress is critical in obtaining our objective. We will expose the fish to sound levels that are not physically harmful to the study objects.

## 2) adverse effects on the environment

The sound levels that we expose the fish to in the floating pen are not high enough to cause any physical injuries or permanent hearing loss. Although the sound itself may be heard by nearby aquatic animals, they may swim away from the sound temporarily to avoid auditory masking or physiological effects. We expect aquatic animals to resume their distribution and normal behaviour either during or right after the sound exposure.

## 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.

We have done an extensive literature review on studies of the effects of seismic surveys on fish. Also, we are being advised by fellow experts from all over the world. We also visited conferences on topics that relate to these proposed studies. The current state of the art is an urgent need to do studies on the more long-term exposure and long-term effects that will give insights into potential population consequences of seismic surveys.

## 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.

The animal procedures will be carried out at [REDACTED], research institute at the [REDACTED] [REDACTED] is specialised in applied research regarding marine aquaculture and ecology.

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

[REDACTED] offers excellent research facilities for the housing, maintenance and care of different North Sea fish species. It is right next to our field site, making the transfer of fish between holding tanks and outdoor experimental pen very quick, thus minimizing transfer stress experienced by fish.

## 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.

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

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

The fish that are exposed to the sound exposure might induce increased stress levels and consequently also affect the immune response and growth negatively.

Explain why these effects may emerge.

Sound can induce stress and stress can induce reduced immune response and growth.

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

Fish housing facilities are provided by ██████████, who is very experienced in aquaculture. marine research.

### **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.

If we spot fish that are swimming just below the surface, with their gills wide open, this means that the fish is quite ill and probably will not recover, we will catch and euthanize the fish with percussive blow to the head to free them from any unnecessary suffering.

Indicate the likely incidence.

Based on our previous experiments with tagged fish, which were more short-term but many, we expect the likelihood that this occurs to be small.

### **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').

Fish catching (at the North sea) and transferring - mild

Weighing, measuring and transferring the fish from holding tank to outdoor pen - mild

Implanting PIT tag - mild

Taking blood sample (3 times) - mild

Weighing and measuring the fish at the end of the experimental period - mild

Sound exposure - mild

Overall - moderate

## **End of experiment**

### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The long-term effects on body condition (fat ratio) and maturation (gonad development) can only be done by dissection for which the fish need to be sacrificed.

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

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

Yes





## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure   |
|---------------|--|
| 4             | Full seismic survey effects on tagged fish while free-ranging at sea |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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



We want to study the effects of a full seismic survey on free-ranging fish. This experiment will be conducted in an offshore wind farm in the Belgian North Sea and an offshore wind farm in the Dutch North sea. The site in the Dutch North sea will be exposed to the seismic survey and the site in the Belgian North Sea will serve as a control site. We will also develop our methodology and collect base line data in Belgium, one year before the actual exposure. Within this appendix we will apply for approval for the part of the experiment that will be conducted in the

Netherlands, for the Belgian part we will (have to) apply in Belgium. Nevertheless, we will here explain the rationale and set-up for the full experiment.

Within this project we most often study captive fish in a net pen. This approach allows the fish more space than in an indoor fish tank, also provides conditions of a more natural sound field than indoor tests, and yields excellent possibilities for behavioural measurements of high resolution and replication with individuals of known history and background ( ). However, the behaviour of fish in an enclosure might not be representative for free-ranging fish in the wild and information on the real thing (an actual seismic survey) in the wild is the explicit call from society (policy makers responsible for sustainable exploitation of marine resources, off-shore industry that requires permission for noisy operations). Parallel studies that allow comparisons between captive and free-ranging fish and natural and artificially manipulated sound sources are therefore needed and the optimal approach to gain fundamental and applied insights ( ). Previous experiments in both the Netherlands and

Belgium have shown that Atlantic cod have a relatively high site fidelity around wind farms in the period from June until October (Winter et al. 2010; Reubens et al., 2013). This makes cod (in wind farms) ideal for studying noise impact on wild free-ranging fish.

**Reubens, J.T.; Pasotti, F.; Degraer, S.; Vincx, M. (2013).** Residency, site fidelity and habitat use of Atlantic cod (*Gadus morhua*) at an offshore wind farm using acoustic telemetry. *Mar. Environ. Res.* 90: 128–135. [hdl.handle.net/10.1016/j.marenvres.2013.07.001](https://hdl.handle.net/10.1016/j.marenvres.2013.07.001)

**Slabbekoorn, H. (2014).** Aiming for progress in understanding underwater noise impact on fish: complementary need for indoor and outdoor studies. In: Popper, A.N., Hawkins, A.D. (Eds.), *The Effects of Noise on Aquatic Life*, Budapest Conference Proceedings. Elseviers.

**Winter, H.V., Aarts, G. & van Keeken, O.A. (2010).** Residence time and behaviour of sole and cod in the Offshore Wind farm Egmond aan Zee (OWEZ). *IMARES Report C038/10, NoordzeeWind Report OWEZ\_R\_265\_T1\_20100916.*

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

We will catch the fish with a fishing rod from or close to the research vessel. The fish will then be put into an anesthetic bath with 2-phenylethanol. Once anesthetised, the fish will be implanted with a small acoustic tag with accelerometers (volume: 5.8 cm<sup>3</sup>; weight : 12.3 g; V13AP, Vemco or similar type of other brand) in its abdominal cavity with an incision of 2 cm and sutures (fig. 1). The tags are less than 5% of the fish body weight and is not expected to alter the swimming dynamics of the fish. The handling process (anesthesia and tagging) will take less than five minutes and the fish will be back in the water for recovery within a few minutes after surgery.

The fish will be placed in a recovery tank for 0.5 to 2 hours before being released in the sea again. An individual will be released once it resumed normal swimming behaviour, this recovery time can differ per individual, but we aim to keep this time as short as possible. We will use a special release cage by which we set the fish free at their usual swimming depth close to the bottom, which has proven to be a successful method. We expect the fish behaviour – in the sea - to recover back to normal patterns within two days. As in standard practice, no analgesics will be used after the surgical implantation. From our experience, fish do not show signs of pain after such minor surgeries. Research on analgesia in fish is still in its infancy and very little is known about the possibilities and consequences of its usage (Gräns et al., 2014; Sneddon, 2012; Stevens, 2008).



Figure 1: Tagging at the research vessel

### Experimental design

Cod on both locations (Belgian and Dutch North sea) will be equipped with tags that alternate between emitting information on their position or averages of accelerometer-data (from three axis) every 20

seconds as long as the fish is in proximity of the receiver stations. The tag-batteries last for 7 weeks, but we will track the behaviour at least for 5 weeks to make sure that the absence of a signal is not due to empty batteries. The data from the first or 2 days will be excluded to minimize the influence of tagging-recovery on baseline levels. The first two weeks will be used to determine baseline levels for parameters such as absence/presence, location, swimming depth, speed, overall dynamic body acceleration (linked to energy metabolism). After these two weeks there will be a full seismic survey of maximum 4 days around the Dutch site, the Belgian site serves as a control. After the survey we will track the behaviour for another two weeks to assess whether – if fish changed their behaviour – return to their baseline levels and whether fish that left the area return after the survey. The data will be retrieved from the receiver stations and not from the tags in the fish, still, the data can only be retrieved after the entire 5 weeks.

References:

- Gräns, A., Sandblom, E., Kiessling, A. and Axelsson, M.** (2014). Post-surgical analgesia in rainbow trout: Is reduced cardioventilatory activity a sign of improved animal welfare or the adverse effects of an opioid drug? *PLoS One* **9**,.
- Sneddon, L. U.** (2012). Clinical Anesthesia and Analgesia in Fish. *J. Exot. Pet Med.* **21**, 32–43.
- Stevens, E. D.** (2008). " Pain " and analgesia in fish : What we know , what we do not know , and what we need to know , before using analgesics in fish. In *Conference: Blue sky to deep water: the reality and the promise. ANZCCART Proceedings, At Auckland, New Zealand*, pp. 115–124.

---

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

In total we want to use 99 Atlantic cod for this experiment; 33 for a pilot in Belgium; 33 for the actual experiment in Belgium and 33 for the actual experiment in the Netherlands. We cannot apply for an experiment in the Belgium waters via this application, so with this application we apply for the use of 33 cod in the Netherlands. We actually need data from 30 fish per site and the pilot instead of 33, but we take into account that maximum 3 fish will not recover from tagging and will not be released in the North sea again (based on previous experience 1 or 2 non-recovering individuals per 30 fish is most likely). Since we will tag wild, free-ranging fish, there is some uncertainty about the data that we will collect, because fish can swim away and never return. We have taken this into account for the two power analysis' (p-value at 0.05) we made.

*(1) power to detect differences in proportion of fish leaving between control and experimental site*

We also do not anticipate fish leaving the experimental site, but this could be a possible response to the seismic experiment. If fish do leave, one simple statistical test to determine if the proportion leaving is greater than at the control site is a test for differences in proportions (Cohen, 1988, Chapter 6). Figure 1 shows how power changes as probability of leaving the experimental site increases, assuming probability of leaving the control site is zero, and n=30 fish at both control and experimental sites. The horizontal line indicates a target power of 0.8, which is achieved with a probability of leaving of 0.13 – this corresponds to 3.9 of the 30 fish leaving. Hence, we conclude that if the experiment causes an average of 4 or more fish to leave the experimental site, we should have good power to reject the null hypothesis of no difference between control and treatment using a simple statistical test.

---

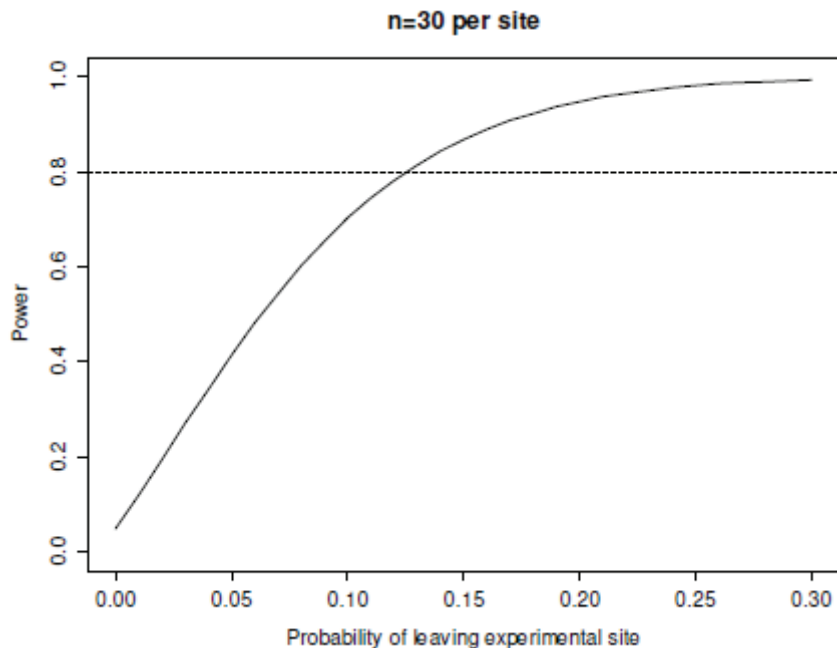


Fig. 5. Power analyses for 30 tagged Atlantic cod per site to assess the statistical threshold to be able to state whether or not more individuals leave the treatment site than the control site (plot by Len Thomas).

*(2) power to detect changes in fish depth associated with the experimental protocol, as a function of sample size*

We will look into a lot of different parameters such as spatial use of the environment and energy metabolism. For this section, we will focus on the potential change in depth, as an example, which will be based on the pressure sensor and/or 3d position from the tags.

Fish swimming depth changes due to other factors than sound exposure, such as time of day, so we have to take other factors into account by using control baseline data. A simple test for a decrease in depth from conditions without to conditions with sound exposure is a one-sided t-test (Cohen 1988, Chapter 2), comparing the mean depth in the baseline period to the mean depth during the experimental period. To undertake the power analysis, we again chose a target power of 0.8, and determined the mean decrease in depth that was detectable with this target power given sample sizes ranging from 10 (a pessimistic number, assuming two thirds of experimental fish are lost) to all 30 (the target number). To obtain the standard deviation of change in depth between fish, we analysed an actual sample dataset of depths of 14 tagged Atlantic cod individuals in the Belwind wind farm off the Belgian coast (data from Jan Reubens) measured intermittently on multiple Vemco (VR2AR) receiver stations (2016-data).

We found that depth changes periodically over the day, as expected, with the standard deviation of depth ranging from 1.1 to 2.8 m. We took the mean of these measures, 1.53m, as a crude indication of the standard deviation of possible fish responses to the experiment. Results are shown in Figure 2. Given the target sample size, a decrease in depth of 0.7m is detectable with high power; with only 10 fish, the detectable change of depth increases to 1.3m. We may anticipate losing some fish during the experiment, but a few losses (say 5 or less) will have little effect on the statistically detectable decrease in depth. We could do this analysis for depth as we had already data on this, but we expect similar power results for other spatial positioning data.

We anticipate using more sophisticated analyses on the real experimental data, and expect that detectable effect sizes will be smaller than those given above. In addition, we plan to ask more sophisticated questions (see e.g., Harris et al. 2016), using multivariate responses, using the time-series nature of the data (accounting for temporal autocorrelation), and looking at dose vs response (c.f. Miller et al. 2014) as well as dose vs response intensity (c.f. DeRuiter et al. 2013).

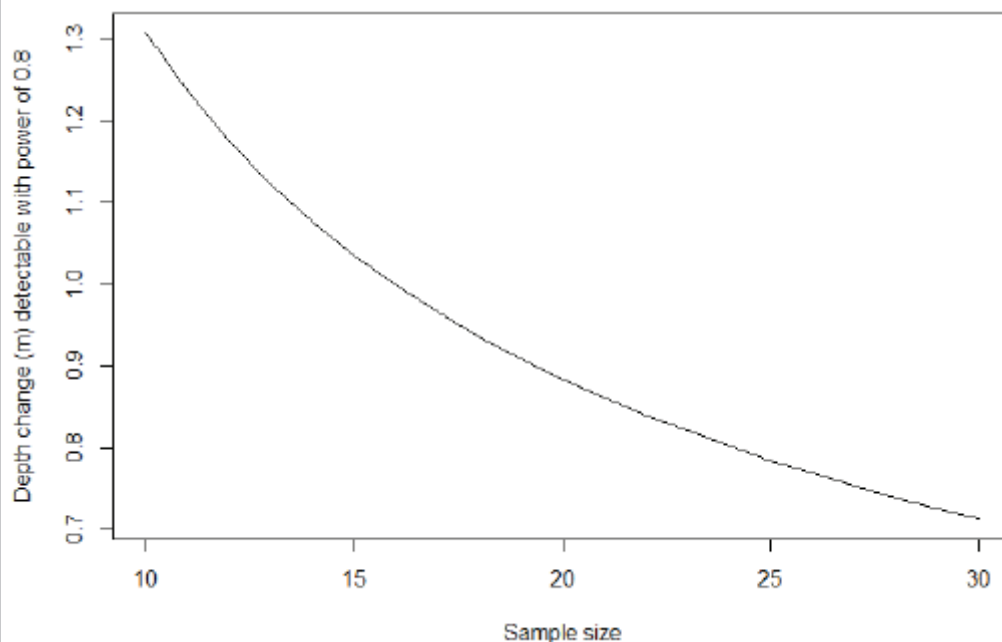


Fig. 2. Power analysis for 10 to 30 tagged Atlantic cod individuals at the treatment site to assess the statistical detection threshold for depth changes from before to during exposure to seismic survey sound pulses (plot by Len Thomas).

**Cohen, J.** 1988. *Statistical power analysis for the behavioural sciences*. Second Edition. Elsevier, ISBN: 978-0-12-179060-8.

**DeRuiter, S.L., Southall, B.L., Calambokidis, J., Zimmer, W.M.X., Sadykova, D., Falcone, E.A., Friedlaender, A.S., Joseph, J.E., Moretti, D., Schorr, G.S., Thomas, L. & Tyack, P.L.** 2013. First direct measurements of behavioural responses by Cuvier's beaked whales to mid-frequency active (MFA) sonar. *Biology Letters* 9: 20130223.

**Harris, C.M., Thomas, L., Sadykova, D., DeRuiter, S.L., Tyack, P.L., Southall, B.L., Read, A.J. & Miller, P.J.O.** 2016. The challenges of analyzing behavioural response study data: An overview of the MOCHA (Multi-study Ocean acoustics Human effects Analysis) project. Pages 399-407 in Popper, A.N. and A. Hawkins. (Eds), *The Effects of Noise on Aquatic Life II. Advances in Experimental Medicine and Biology* 875. ISBN 978-1-4939-2981-8.

**Miller, P.J.O., Antunes, R.N., Wensveen, P.J., Samarra, F.I.P., Alves, A.C., Kvadsheim, P.H., Kleivana, L., Lam, F.-P.A., Ainslie, M.A., Tyack, P.L. & Thomas, L.** 2014. Dose-response relationships for the onset of avoidance of sonar by free-ranging killer whales. *Journal of the Acoustical Society of America* 135: 975-993.

## B. The animals

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

We will use Atlantic cod (*Gadus morhua*) for this experiment. We will catch the cod in the North sea using fishing rods and release them where they were caught. We will use wild-caught cod because they are known to be residential in the wind farm (previous experiment showed them to be so) and wild cod might exhibit more natural behaviour than fish from a hatchery. Also, it is against the law to release hatchery-reared Atlantic cod into the wild, especially since we will not be able to catch the fish back again after the experiment.

In total we want to use 99 Atlantic cod for this experiment; 33 for a pilot in Belgium; 33 for the actual experiment in Belgium and 33 for the actual experiment in the Netherlands (assuming that maximum 3 individuals per group do not recover from tagging and will be sacrificed, we need data from 30 fish per group). We cannot apply for an experiment in the Belgium waters via this application, so with this application we apply for the use of 33 cod in the Netherlands. For the 66 fish that will be tagged in Belgium, we will apply for ethical approval via the authorities in Belgium.

We chose to use Atlantic cod because it is an important and abundant fish species with a large distribution. Besides, cod is residential in wind farms (based on own experiences). Also accelerometer-data of cod have been correlated to energy metabolism (publication in prep), meaning that our accelerometer-data will also yield insight into energy metabolism under seismic survey conditions. Furthermore, cod hearing ability and ecology are similar to several important commercial fishes, such as European seabass (*Dicentrarchus labrax*), haddock (*Melanogrammus aeglefinus*), whiting (*Merlangius merlangus*) and pollock (*Pollachius pollachius*). At last, several cod stock populations collapsed in the 1990's, many others are at risk and therefore the offshore industry and fisheries should be interested in the effects of seismic surveys on cod.

### 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.

#### Replacement

The behaviour of fish can only be studied in living specimens. Response behaviour to acoustic stimuli is not well-known enough to be suitable for studies that solely use modelling. A replacement is therefore not possible.

#### Reduction

We use a limited amount of fish to yield information on several parameters that will yield insight on how free-ranging wild cod cope with seismic surveys. Numbers of fish that we can use are mainly limited by technical limitations in the tagging system. Also, we make use of only two locations (one treatment and one control site). Reason for this is the extremely high costs for studies like this. However we expect – based on statistical (power) analysis – that the numbers of fish are high enough to yield valuable results (see answer to last question of section A for statistical support on this).

#### Refinement

We have chosen to use Atlantic cod for this experiment because a previous experiment using Atlantic cod with a similar design has yielded valuable results. The Belgium site will also be the same as in the previous experiment. Multiple researchers of our team have experience with fishing, tagging and processing data from acoustic tags.

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

#### 1) animal suffering, pain or fear

The aim of this project is to investigate how sound stimuli cause stress and behavioural changes in fish. Great care on the handling of fish to minimise stress is critical for obtaining our objective. During the tagging process, 2-phenylethanol will be used as anesthesia to reduce mobility, sensory input and pain. The process is quick and the fish are expected to recover quickly after the procedure. We also allow ample of time for fish to recover from tagging and acclimatise to their new environment.

#### 2) adverse effects on the environment

The sound levels that we expose the fish to are not high enough to cause physical injuries or hearing loss. Although the sound itself may be heard by nearby aquatic animals, they may swim away from the sound

We expect aquatic animals to resume their distribution and normal behaviour either during or right after the sound exposure.

## 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.

We have done an extensive literature review on the effects of seismic surveys on fish. Also, we are being advised by fellow experts from all over the world and we visit conferences on topics that relate to these proposed studies. We think that there is an urgent need to do studies that ultimately give insight into population consequences of seismic surveys. We are aware of studies that report decreased catch rates and fewer fish on echosounders after seismic surveys. But we are not aware of any study that followed individual wild free-ranging fish before, during and after seismic surveys.

## 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.

Catching and tagging will be done from/on a research vessel. The vessel contains three tanks, one for caught fish (in case multiple fish are caught at the same time); one with the anaesthesia and where the surgery takes place; and one recovery tank. The seawater in these tanks will regularly be refreshed using a pump. After the fish resume normal swimming behaviour, the fish is released where we caught it at the appropriate depth.

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

We are interested in the natural behaviour, the best way to achieve this is to study wild animals in the wild.

## 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.

Prior to the tagging procedure, the fish will be put into an anesthetic bath of 2-phenylethanol solution. 2-phenylethanol is known to be an effective anaesthesia for fish with a short recovery time. As in standard

practice, no analgesic is necessary after surgery implantation on fish as fish do not show signs of pain after the procedures (Stevens, 2008).

Reference:

**Gräns, A., Sandblom, E., Kiessling, A. and Axelsson, M.** (2014). Post-surgical analgesia in rainbow trout: Is reduced cardioventilatory activity a sign of improved animal welfare or the adverse effects of an opioid drug? *PLoS One* **9**,.

**Sneddon, L. U.** (2012). Clinical Anesthesia and Analgesia in Fish. *J. Exot. Pet Med.* **21**, 32–43.

**Stevens, E. D.** (2008). " Pain " and analgesia in fish : What we know , what we do not know , and what we need to know , before using analgesics in fish. In *Conference: Blue sky to deep water: the reality and the promise. ANZCCART Proceedings, At Auckland, New Zealand*, pp. 115–124.

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

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

- 1) The tagging-incision might get infected.
- 2) The physical presence might interfere with abdominal organs.

Explain why these effects may emerge.

- 1) The environment in which the tagging is done is not completely sterile (a research vessel).
- 2) The insertion of the tag might be hindered physically by internal organs.

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

- 1) We will make the environment as clean as possible and use sterile materials. We will make sure that both during and after the tagging, no seawater can enter the incision.
- 2) We will only push a tag through the incision if it goes very smoothly.

### **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.

If a fish does not resume normal swimming behaviour, the fish will be euthanized with a percussive blow to the head to free them from any unnecessary suffering.

Indicate the likely incidence.

Based on earlier experience with tagging wild cod on a research vessel, we expect that one or two (maximum 3) individuals will not recover from the anesthesia and tagging procedure. So far, we have never experienced this during earlier studies with European seabass.

### **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').

Catching the fish - moderate  
Surgical implantation of acoustic tag - moderate  
Sound exposure - mild  
Overall - moderate

## **End of experiment**

### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

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



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

---

Yes

---

# DEC-advies

---

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD1060020171085
2. Titel van het project: 'PCAD4Cod' - Impact of seismic survey sound exposure on fish.
3. Titel van de NTS: Impact van seismisch onderzoek op kabeljauw.
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: DEC Leiden
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: 06-04-2017
  - aanvraag compleet: 06-04-2017
  - in vergadering besproken: 28-04-2017 & 12-05-2017
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van 04-05-2017 t/m 05-05-2017
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 05-05-2017
  - advies aan CCD: 16-05-2017
7. De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD
8. Eventueel horen van aanvrager  
N.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum: 04-05-2017
  - Strekking van de gestelde vragen:  
De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de go/no-go momenten, statistiek, gebruik wildvang en analgesie.
  - Naar aanleiding van deze vragen is het projectvoorstel inclusief bijlages en de NTS naar tevredenheid door de aanvrager aangepast.
10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
  - Aard expertise: Statistiek
  - Deskundigheid expert: medische statistiek
  - Datum verzoek: 02-05-2017
  - Strekking van het verzoek: berekening groepsgrootte
  - Datum expert advies: 16-05-2017
  - Advies expert: De gegeven berekening is correct.

## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over deze projectaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijke terrein is aanwezig binnen de DEC.
4. Geen van de DEC leden is betrokken bij het betreffende project.

## **C. Beoordeling (inhoud)**

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De aanvraag komt overeen met voorbeeld 4B uit de handreiking 'Wat is een project': De verschillende subdoelen zijn niet uitkomstafhankelijk van elkaar maar zijn allemaal noodzakelijk om de hoofddoelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van dit project is inzicht verkrijgen in de effecten van seismische surveys op zwempatronen/ruimtelijke vermijding, foerageeractiviteit, gewinning en energiemetabolisme en kan het effect van seismische surveys op vissen worden verminderd door aanpassing van temporale of spectrale eigenschappen van de procedure en geluidsbron. Het uiteindelijke doel is het verkrijgen van inzicht in de gevolgen van seismische surveys op het gedrag en de fysiologie van vissen. Het betreft hier fundamenteel onderzoek. De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en uiteindelijk doel. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status is van het onderzoeksveld en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. De hoeveelheid lawaai onder water, veroorzaakt door mensen, is de laatste decennia in de Noordzee, maar ook wereldwijd toegenomen. Dit heeft geleid tot een groeiende zorg over het effect hiervan op aquatisch leven, inclusief vissen. Er is echter nog weinig inzicht in de mogelijke nadelige effecten op de individuele gezondheid van vissen en op hun populatie dynamiek. Er is daarom dringend behoefte aan meer kennis over de relatie tussen seismische surveys en het gedrag en de fysiologie van vissen. De DEC is van mening dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het verkrijgen van inzicht in de gevolgen van seismische surveys op het gedrag van vissen en hun fysiologie zijn de proefdieren, de wetenschappers, de vispopulatie, de visserij en natuurbeschermers. Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun

natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Waarden die voor de wetenschappers bevorderd worden: De wetenschappers zullen kennis verkrijgen. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de wetenschappers verbeteren door publicaties. Waarden die voor de vispopulatie en de visserij bevorderd worden: meer inzicht in de gevolgen van geluid kan bijdragen aan het in stand houden van de vispopulatie. Waarden die voor de natuurbeschermers worden bevorderd: het onderzoek en de bevindingen zullen een cruciale rol spelen in de wetgeving en het vergunnen van luidruchtige offshore activiteiten.

6. Hoewel het geluid gehoord kan worden door andere aquatische dieren in de buurt is er voor zover de DEC kan beoordelen geen sprake van substantiële milieueffecten.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. Het onderzoeksvoorstel en het team zijn geselecteerd in een open mondiale competitie op basis van wetenschappelijke inhoud en expertise. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te realiseren. De onderzoeksgroep heeft veel expertise op het gebied van experimenteel onderzoek met vissen en met name over de relatie tussen vis gedrag en bio-akoestiek. In de afgelopen jaren zijn volgens vergelijkbare strategieën en aanpak belangrijke wetenschappelijke resultaten behaald.
8. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de looptijd van het project.

#### *Welzijn dieren*

9. Er wordt gebruik gemaakt van zowel wildvang als gekweekte vissen. De onderzoeker motiveert duidelijk waarom voornamelijk wildvang gebruikt zal gaan worden. Wildvang heeft de voorkeur omdat er verschillen kunnen zijn met kweekvis in gedrag en reacties op geluid. Gebruik van kweekvis zal een extra vertaalslag opleveren om straks de resultaten naar het veld te extrapoleren. Wildvang is ook nodig om de data van de floating pen met die van de tagged, free-ranging fish te vergelijken. De vissen worden, na vangst gehuisvest bij een stichting die beschikt over uitstekende faciliteiten voor huisvesting en verzorging van verschillende Noordzee vissoorten. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, en/of zwerfdieren. De toegepaste methoden voor anesthesie zijn conform de Richtlijn.
10. De DEC is ervan overtuigd dat de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. De vissen worden gehuisvest bij een stichting die beschikt over uitstekende faciliteiten voor huisvesting en verzorging van verschillende Noordzee vissoorten.
11. De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke heeft gedaan om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. De DEC schat dat de dieren als gevolg van de het implanteren en verwijderen van de tag cumulatief maximaal matig ongerief zullen ervaren. Deze inschatting is in overeenstemming met het niveau van het cumulatief ongerief ingeschat door de onderzoekers.

12. De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast doordat de dieren een tag geïmplantéerd krijgen. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid. Hierdoor zullen de dieren minder natuurlijk gedrag kunnen vertonen.
13. Naar mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van de incidentie met betrekking tot het bereiken van een humaan eindpunt eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

*3V's*

14. In het project wordt de keuze voor de diermodellen duidelijk onderbouwd. De betrokken dieren en het gekozen diermodel zijn het meest geschikt voor deze studieopzet. Atlantische kabeljauw is een belangrijke en overvloedige vissoort met een grote verspreiding. Tevens is het gehoor en de ecologie van kabeljauw vergelijkbaar met andere belangrijke commerciële vissen zoals zeebaars, schelvis, wijting en koolvis. De desbetreffende dierproef berokkent de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade. De DEC is ervan overtuigd dat er geen alternatieven beschikbaar zijn voor het voorgestelde gebruik van intacte dieren om de doelstelling van dit project te realiseren.
15. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereisten van vermindering van dierproeven. Zo worden de dieren aan een reeks van meervoudige behandelingen blootgesteld zonder dat dit extra schade veroorzaakt. De onderzoeksgroep heeft jarenlange ervaring met dit soort experimenten. Bovendien beschikt de onderzoeksgroep over een team van biotechnici die de benodigde ervaring hebben met proefdieronderzoek. De DEC is ervan overtuigd dat het onderzoek ethisch verantwoord zal worden uitgevoerd. De DEC acht het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch geschat.
16. De uitvoering van het project is in overeenstemming met de vereisten van verfijning van dierproeven en is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd. Bij de opzet van dit onderzoek wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door het gebruik van adequate anesthesie waar nodig. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven dierproeven zo humaan mogelijk zullen worden uitgevoerd.
17. Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

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

18. De aanvrager zal in het project in gebruik maken van zowel mannelijke als vrouwelijke vissen.
19. Een deel van de dieren wordt in het kader van het project gedood. Door middel van dissectie kunnen lange termijn effecten op vet ratio en gonade ontwikkeling worden bepaald. Het merendeel van de dieren wordt in leven gelaten en terug gezet in het wild. Kweek vissen zullen na afloop van het experiment worden gedood omdat deze niet terug gezet kunnen worden in het wild. Het doden van de dieren gebeurt volgens een voor de diersoort passende dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden voor dit projectvoorstel geen niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren gebruikt.

*NTS*

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.

## **D. Ethische afweging**

1. Rechtvaardigt het verkrijgen van inzicht in de effecten van seismische surveys op zwempatronen/ruimtelijke vermijding, foerageeractiviteit, gewenning en energiemetabolisme en kan het effect van seismische surveys op vissen worden verminderd door aanpassing van temporale of spectrale eigenschappen van de procedure en geluidsbron met als uiteindelijk doel is het verkrijgen van inzicht in de gevolgen van seismische surveys op het gedrag van vissen en hun fysiologie, het ongerief dat de dieren wordt aangedaan?
2. Project gericht op het verkrijgen van meer kennis over de relatie tussen seismische surveys en het gedrag en fysiologie van vissen.  
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.  
Waarden die voor wetenschappers bevorderd worden: gering voordeel.  
Waarden die voor de vispopulatie, visserij en dierbeschermers bevorderd worden: groot voordeel.  
De DEC is van mening dat de belangen voor de vispopulatie in het algemeen zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Vissen maken gebruik van geluid voor allerlei activiteiten, bijvoorbeeld voor oriëntatie, communicatie, foerageren, het ontwijken van roofdieren of het vinden van een partner. De hoeveelheid lawaai onder water, veroorzaakt door mensen is in de laatste decennia zowel wereldwijd als in de Noordzee beduidend toegenomen. Sommige geluidsimpulsen zijn zo hard dat vissen dichtbij de bron lichamelijk letsel kunnen oplopen of zelfs dood gaan. Dit heeft geleid tot een groeiende zorg over het effect hiervan op aquatisch leven, inclusief vissen. Er is echter nog weinig inzicht in de mogelijke nadelige effecten op de individuele gezondheid en populatie dynamiek. De DEC acht het daarom van essentieel belang dat er meer kennis wordt verkregen over de gevolgen van geluidsimpulsen op vissen. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Hiertoe zullen dieren worden gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken, waardoor het ongerief van de dieren zo veel mogelijk beperkt blijft.
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling van dit project. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de onderzoeksgroep voldoende ervaring heeft met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven om de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC onderschrijft dat de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kunnen worden en acht het gebruik van het aantal dieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren gerechtvaardigd.

## E. Advies

1. Advies aan de CCD

**De DEC adviseert de vergunning te verlenen.**

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
  - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
  - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
  - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
  - De vaststelling dat het project niet vergunning plichtig is om de volgende redenen:...
  - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
  - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn tijdens de beoordeling van dit projectvoorstel geen echte knelpunten en of duidelijke dilemma's naar voren gekomen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Leiden

Postbus 9502

2300 RA LEIDEN



**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  
AVD1060020171085

**Bijlagen**

2

Datum 18 mei 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 18 mei 2017. Het gaat om uw project "PCAD4Cod" - Impact of seismic survey sound exposure on fish". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1060020171085. 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:**

18 mei 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1060020171085

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**  
18 mei 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1060020171085

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10600  
Naam instelling of organisatie: Universiteit Leiden  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 27368929  
Straat en huisnummer: Rapenburg 70  
Postbus: 9502  
Postcode en plaats: 2300 RA LEIDEN  
IBAN: [REDACTED]  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Universiteit Leiden/ Faculteit W&N

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: PhD-candidate  
Afdeling: [REDACTED]  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]

**Datum:**  
18 mei 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1060020171085

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: PhD-candidate  
Afdeling: [REDACTED]  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]  
Functie: PhD-candidate  
Afdeling: [REDACTED]  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 april 2017  
Geplande einddatum: 31 december 2021  
Titel project: PCAD4Cod' - Impact of seismic survey sound exposure on fish  
Titel niet-technische samenvatting: Het effect van seismisch onderzoek op zout:: ater-vissen  
Naam DEC: DEC Leiden  
Postadres DEC: [REDACTED] LUMC, Postbus 9600 2300 RC Leiden  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.684,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:



Functie:

directeur

Plaats:

Leiden

Datum:

17 mei 2017

**Datum:**

18 mei 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1060020171085



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Leiden

Postbus 9502

2300 RA LEIDEN



**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  
AVD1060020171085

**Bijlagen**

2

Datum 18 mei 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 18 mei 2017

Vervaldatum: 17 juni 2017

Factuurnummer: 171085

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1060020171085	€ 1.684,00

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

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** dinsdag 30 mei 2017 17:22  
**Aan:** Info-zbo; [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: vraag bij de behandeling van aanvraag AVD1060020171085

**Categorieën:** Dossier: [REDACTED]

Dank [REDACTED],  
 Indien ik van dienst kan zijn ergens mee of als ik nodig ben voor de procedure dan hoor ik het graag.  
 Ik hoop namelijk dat we onnodige vertraging zo veel mogelijk kunnen voorkomen :)  
 Vriendelijke groet,

---

**Van:** Info-zbo [info@zbo-ccd.nl]  
**Verzonden:** dinsdag 30 mei 2017 15:21  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: vraag bij de behandeling van aanvraag AVD1060020171085

Beste [REDACTED]  
 Dank voor de aanvulling. De aanvraag zal aanstaande vrijdag door de CCD besproken worden,  
 Groeten [REDACTED]  
 Namens **Centrale Commissie Dierproeven**  
**www.centralecommissiedierproeven.nl**

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

T: 0900 2800028  
 E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** dinsdag 30 mei 2017 14:20  
**Aan:** info@zbo-ccd.nl; [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: vraag bij de behandeling van aanvraag AVD1060020171085

Beste [REDACTED]  
 Wij hebben de NVWA in februari 2017 op de hoogte gebracht van het huisvesten van vissen op de locatie [REDACTED] (tezamen met de registratiegegevens). Deze locatie is derhalve geen nieuwe locatie waar proefdieren worden gehuisvest en deze locatie valt onder de instellingsvergunninghouder Leiden Universiteit. Vraag G in de appendix 1-3 had derhalve met nee beantwoord moeten worden. In appendix 4 klopt het antwoord op de vraag, dit omdat het niet mogelijk is om een niet nader te duiden locatie op open zee als proefdierlocatie aan te duiden. Ik hoop dat de aanvraag met deze extra informatie toch in behandeling kan worden genomen en we zien graag de vergunning tegemoet.  
 Met vriendelijke groet,

---

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

**Sent:** dinsdag 23 mei 2017 12:12

**To:** ██████████

**Subject:** vraag bij de behandeling van aanvraag AVD1060020171085

Geachte ██████████,

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning gedaan. Het betreft uw project: 'Impact of seismic survey sound exposure on fish' met aanvraagnummer AVD1060020171085. In uw projectvoorstel beschrijft u dat een deel van het onderzoek wordt uitgevoerd bij de ██████████. U geeft aan dat het onderzoek plaatsvindt in een instelling die niet onder een instellingsvergunning valt. U bent wel verplicht deze nieuwe locatie aan te melden bij de NVWA voordat de dierproeven aanvangen. Op deze wijze valt de locatie dan onder de instellingsvergunning van vergunninghouder 10600. U kunt de locatie aanmelden via [chd@nvwa.nl](mailto:chd@nvwa.nl)

Vriendelijke groet, ██████████

Uit de memorie van toelichting bij de dierproevenregeling

#### 2.1.1 Direct melden van wijzigingen met betrekking tot de instellingsvergunning

Na verlening van een instellingsvergunning zal de vergunninghouder wijzigingen die betrekking hebben op de instellingsvergunning onverwijld door moet geven aan de Minister. Het gaat daarbij om wijzigingen in één van de personen die op grond van artikel 6, derde lid, van de wet in de instellingsvergunning worden vermeld, en elke significante wijziging van de structuur of de werking van een inrichting die het dierenwelzijn negatief kan beïnvloeden. Hierbij moet worden gedacht aan gevallen waarbij op basis van de gewijzigde situatie mogelijk anders op een aanvraag om een instellingsvergunning zou zijn beslist, dan wel wijzigingen die bekend moeten zijn bij de toezichthouder met het oog op inspecties. Hieronder valt in ieder geval elke nieuwe locatie waar proefdieren worden gehuisvest of dierproeven worden verricht, grootschalige verbouwingen op deze locaties en reorganisaties. De vergunninghouder geeft deze wijzigingen door aan de Minister. De wijzigingen moeten worden doorgegeven zodra de vergunninghouder hier redelijkerwijs van op de hoogte kan zijn.

**Centrale Commissie Dierproeven**

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Leiden

[REDACTED]  
Postbus 9502  
2300 RA LEIDEN  


**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  
AVD1060020171085  
**Bijlagen**  
1

Datum 6 juni 2017  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 18 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "PCAD4Cod' - Impact of seismic survey sound exposure on fish" met aanvraagnummer AVD1060020171085. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 23 mei 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u een vraag gesteld over de locatie waar de dierproeven worden uitgevoerd. Uw antwoorden hebben niet geleid tot aanpassing van de aanvraag.

#### **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 "PCAD4Cod' - Impact of seismic survey sound exposure on fish" starten. De vergunning wordt afgegeven van 6 juni 2017 tot en met 31 december 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Leiden gevoegd. Dit advies is opgesteld op 16 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:**  
AVD1060020171085

### **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

naam en adres



ir.

Algemeen Secretaris

### **Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

**Naam:** Universiteit Leiden

**Adres:** Postbus 9502

**Postcode en plaats:** 2300 RA LEIDEN

**Deelnemersnummer:** 10600

deze projectvergunning voor het tijdvak 6 juni 2017 tot en met 31 december 2021, voor het project "PCAD4Cod' - Impact of seismic survey sound exposure on fish" met aanvraagnummer AVD1060020171085, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Leiden. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is PhD-candidate. Voor de uitvoering van het project is PhD-candidate verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 18 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 18 mei 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 18 mei 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 16 mei 2017, ontvangen op 18 mei 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 23 mei 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1060020171085

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1 Recognizing behaviour with accelerometers in captive fish monitored by video</b>				
	Andere vissen (andere Pisces) / Atlantische kabeljauw	10	100% Matig	
<b>3.4.4.2 Effects of acoustic variation on fish response to sound in a floating pen</b>				
	Andere vissen (andere Pisces) /	920	100% Matig	
<b>3.4.4.3 Sound exposure effects on fish growth and stress physiology in a floating pen</b>				
	Andere vissen (andere Pisces) /	240	100% Matig	
<b>3.4.4.4 Full seismic survey effects on tagged fish while free-ranging at sea</b>				
	Andere vissen (andere Pisces) /	33	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. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van

**Aanvraagnummer:**  
AVD1060020171085

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:**  
AVD1060020171085

## 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 onvermijdelbaar 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:**  
AVD1060020171085

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.

#### **Locatie**

De vergunning wordt verleend voor een project waarbij dierproeven geheel of gedeeltelijk worden verricht buiten een inrichting van een gebruiker (artikel 10g van de wet).

Inventaris Wob-verzoek W17-11										
nr.	document NTS 20171204	wordt verstrekt				weigeringsgronden				
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x			
2	NTS initieel			x						
3	Projectvoorstel				x		x			
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 initieel			x						
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 initieel			x						
6	DEC-advies				x		x			
7	Ontvangstbevestiging				x		x			
8	Verzoek om aanvullende informatie				x		x			
9	NTS aangepast	x								
10	Bijlage beschrijving dierproeven 1 aangepast			x						
11	Bijlage beschrijving dierproeven 2 aangepast			x						
12	Adviesnota CCD		x							x
13	Beschikking en vergunning				x		x			



## Aanvraag

### Projectvergunning Dierproeven

#### Administratieve gegevens

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

## 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	21200
		<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	ATKB
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	
		KvK-nummer	27177149
		Straat en huisnummer	Poppenbouwing 34
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Postbus	
		Postcode en plaats	4191NZ Geldermalsen
		IBAN	NL53RABO0160177529
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	AQUATERRA-KUIPERBURGER
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Adviseur ecologie
		Afdeling	Ecologie
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	



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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |              |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 5 - 2017 |
| Einddatum  | 1 - 5 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- AVD2120020171204 Het nemen van weefsels van vissen ten behoeve van onderzoek naar de visstand, gericht op het formuleren van beheersmaatregelen en het monitoren van de effecten hiervan.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- AVD2120020171204 Het nemen van weefsels van vissen ten behoeve van onderzoek naar de visstand, gericht op het formuleren van beheersmaatregelen en het monitorren van de effecten hiervan.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |            |
|-------------|------------|
| Naam DEC    | ██████████ |
| Postadres   |            |
| E-mailadres | ██████████ |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.287,- 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
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- 

## 6 Ondertekening

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

Naam	
Functie	Senior specialistisch adviseur
Plaats	Geldermalsen
Datum	4 - 4 - 2017
Handtekening	



## Format

### Niet-technische samenvatting

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

### 1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Het nemen van weefsels van vissen ten behoeve van onderzoek naar de visstand, gericht op het formuleren van beheersmaatregelen en het monitoren van de effecten hiervan..
1.2 Looptijd van het project	1 - 5 - 2017 tot 1 -5 - 2022
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Schubben, vinstralen, gehoorsteentjes, kieuwdeksels, maaginhouden

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Binnen de Kader Richtlijn Water en MWTL zijn er doelen gesteld ten aanzien van de visstand. Om die te realiseren, voeren overheden kostbare maatregelen (verbetering van de waterkwaliteit, inrichtingsmaatregelen, maatregelen om de connectiviteit te verbeteren etc.) uit. Het is van belang te onderzoeken of deze doelen gehaald worden (Toestand & Trend monitoring) en als dit niet het geval is waarom dat dan is (Operationele Monitoring en Monitoring voor nader onderzoek). Hiervoor wordt de visstand regulier gemonitord. In dit onderzoek wordt gekeken naar de aard en herkomst van populaties van soorten en leeftijd van individuen binnen deze populaties in waterlichamen. Hiertoe worden vissen gevangen, gemeten en de soort bepaald. In een beperkt aantal gevallen worden een aantal, beperkt belastende, handelingen aan de vissen (gevangen binnen reguliere monitoring) uitgevoerd elk met een specifiek <b>oogmerk</b> . Het betreft het
---	--

nemen van schubben, knippen van vinstralen en vinpunten, het knippen van een stukje van de vin bij zalmachtigen voor DNA analyse en het doden van een aantal vissen om andere weefsels in het laboratorium af te nemen en te onderzoeken.

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

Door het nemen van weefsels van vissen kan inzicht verkregen worden in de leeftijdsopbouw van een populatie, de herkomst, genetische achtergronden en de voedselkeuze. Hiermee kunnen specifieke onderzoeksvragen worden beantwoord waarmee het mogelijk wordt om maatregelen die worden genomen om de ecologische kwaliteit van waterlichamen te verbeteren, efficiënter en meer kosten effectief te maken.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Het betreft vissen uit de wilde fauna. Naar schatting zullen maximaal 35.750 vissen worden gebruikt, [van allerlei soorten die in Nederland voorkomen \(zie: \[www.sportvisserijnederland.nl/vis-water/vissoorten/vissengids-app.html\]\(http://www.sportvisserijnederland.nl/vis-water/vissoorten/vissengids-app.html\)\)](http://www.sportvisserijnederland.nl/vis-water/vissoorten/vissengids-app.html).

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

De vissen worden geselecteerd uit vangsten van bestaande monitoring. Van deze vissen worden weefsels (schubben, vinstralen, stukjes vin) ontnomen waardoor ze kortduren ongemak kunnen ervaren. Zo snel mogelijk na de handeling zullen de vissen weer losgelaten worden in het water van herkomst. De overige vissen worden door een overdosis verdovingsmiddel gedood na vangst en meegenomen naar een laboratorium.

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

Licht

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Het merendeel van de dieren wordt na de weefselafnames weer losgelaten in het water waar ze zijn gevangen. Een deel van de dieren worden direct na het vangen gedood.

## 4 Drie V's

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

Om beoogde doelen te behalen is het noodzakelijk om weefsels van vissen uit de wilde fauna te nemen. Vervanging is hierbij niet mogelijk.

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

Voordat overgegaan wordt tot het nemen van weefsels van vissen, zullen alternatieve mogelijkheden om de vraagstelling te beantwoorden worden overwogen. Het betreft hierbij zaken als analyse van de lengteopbouw van het visbestand en bepaling van de omvang van het visbestand door middel van bevissingen met specifieke vangtuigen.

#### 4.3 **Verfijning**

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

De vissen worden gekozen uit de vangst van de reguliere monitoring en worden dus niet specifiek voor het nemen van de weefsels gevangen. Er wordt volstaan met zo min mogelijk vissen.

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

De vissen wordt slechts kortdurend uit het water gehaald. Hierbij wordt gewerkt met visvriendelijke schepnetten (knooploos netwerk). Bij het hanteren van de vissen wordt gewerkt met natte handen. De meetplank waarop de vissen wordt gelegd is eveneens altijd nat zodat geen beschadigingen aan de vis worden toegebracht. Sedatie en verdoving wordt toegepast.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene

#### gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).

- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Vanuit de vereisten van de Europese Kaderrichtlijnwater (KRW), Natura2000, het Nederlands visstandbeheer is het noodzakelijk inzicht te krijgen in aspecten van de visstand, zoals omvang, aard of herkomst van de populatie, leeftijd van de individuen, waarbij verbeterdoelstellingen ten aanzien van de populatiegrootte eveneens een rol kunnen spelen. Het betreft hier toegepast onderzoek dat door waterbeheerders en overheden wordt gevraagd aan commerciële bureaus, zoals ATKB, teneinde vragen te beantwoorden ten aanzien van te behalen doelen binnen de KRW en het visstandbeheer en/of onderzoek ter behoud van de soort teneinde Nature2000 doelen te kunnen behalen.

De vissen waar de in dit onderzoeksproject beschreven handelingen op zullen worden uitgevoerd, worden gevangen in het kader van de reguliere monitoring. Er zullen dus nooit vangacties worden gestart alleen voor de experimenten beschreven in dit project. De reguliere monitoring betreft enerzijds KRW-monitoring ten behoeve van de regionale waterbeheerders (water- en hoogheemraadschappen) in hun beheergebied, waarbij vissen op soort worden gebracht en de lengte wordt gemeten. Hierbij worden de vissen niet gesedeerd en zijn slecht zeer kort buiten het water (alleen op de meetplank). Na meting worden de vissen direct losgelaten op de plek waar deze zijn gevangen. Anderzijds is er de MWTL-monitoring (programma Monitoring van de Waterstaatkundige Toestand des Lands) in de Rijkswateren (opdrachtgever RWS), waarbij ook vissen alleen op soort worden gebracht, gemeten en losgelaten. Het verschil tussen beide monitoringen is dat de KRW monitoring wordt uitgevoerd volgens het handboek hydrobiologie, waarbinnen per waterlichaam sprake is van een voorgeschreven inspanning en vangtuiggen (zegens, kuilnetten, elektrovisserij). Het MWTL-programma is van oudere datum, en kent een geringere inspanning (voornamelijk met de boomkor). Het wordt echter gehandhaafd omdat men de tijdreeks niet wil doorbreken en dient ook de KRW doelen en kwaliteitsbepaling maar dan op de Rijkswateren.

Daarnaast kent deze monitoring een onderdeel gericht op het vangen van bijzondere soorten en trekvisseren, binnen eveneens internationale kaders. De reguliere monitoring valt niet onder de WOD omdat er na het vangen geen vervolghandelingen met drempel overschrijdend ongerief zijn. Binnen de KRW zijn er verschillende typen monitoring te onderscheiden en wel: de Toestand- en trendmonitoring (T&T); de Operationele monitoring (OM) en de Monitoring voor nader onderzoek. Het doel van de T&T monitoring is het vaststellen en beoordelen van lange termijn (50 jaar) trends voor zowel menselijke activiteiten als veranderingen in natuurlijke omstandigheden en het verzamelen van informatie die moet leiden tot een globale beoordeling van wateren binnen stroomgebied. Het doel van de OM is om de toestand in de gaten te houden van waterlichamen die at risk zijn (d.w.z. hun doelstelling in de planperiode niet dreigen te halen). Hierbij wordt het effect van de genomen maatregelen om de toestand te verbeteren, vast gesteld. De Monitoring voor nader onderzoek dient om te achterhalen waarom een waterlichaam niet voldoet aan de doelstellingen. Dit type monitoring is toegesneden op lokale en specifieke omstandigheden waarbij een veelheid aan vragen kan voorliggen. Zo kunnen maaginhoud analyses inzicht geven in het voedselweb; schubben lezen geeft absoluut inzicht in voorkomende jaarklassen. Gesteld kan worden dat de beschreven dierproeven voor het grootste deel vallen onder de KRW, waarbinnen tot kwaliteitsverbetering van de waterlichamen moet worden gekomen, waarvoor soms nader onderzoek noodzakelijk is. Inzicht in de genetische samenstelling van salmoniden, valt mogelijk niet direct onder de KRW (hoewel de gemaakte vangsten dit voor het overgrote deel wel doen), maar heeft in die zin een Europees karakter (het herstellen van de zalmbestanden op de grote rivieren in Europa) en hangt samen met KRW maatregelen zoals de Kier die in 2018 ingevoerd wordt (beperkte openstelling Haringvlietdam) en het visvriendelijk beheer van de Afsluitdijk.

Het betreft zowel langlopende monitoringsactiviteiten als kleine kortdurende inventarisaties. In beide gevallen is het financieel en praktisch (tijdbestek) niet haalbaar om voor iedere opdracht een aparte projectvergunning aan te vragen. Opdrachtgevers voor het onderzoek zijn dezelfde partijen die ook opdrachtgever zijn bij de reguliere visstandmonitoring zoals hierboven beschreven.

Het onderzoek betreft in principe alle in de Nederlandse wateren voorkomende vissoorten. (zie: <http://www.sportvisserijnederland.nl/vis-water/vissoorten/vissengids-app.html>).

Het overgrote deel van dit onderzoek valt buiten de kaders van de WOD (vangen, determineren, meten). Echter, in een beperkt aantal gevallen zal voor het bepalen van leeftijd, genotype, een klein

weefselmonster worden genomen of zullen de dieren gedood worden ten behoeve van de analyse van organen (otolieten, opercula) en/of maaginhouden.

Het betreft in alle gevallen zeer gestandaardiseerde handelingen waarvan de ongeriefconsequenties voor de verschillende soorten vergelijkbaar en goed in te schatten zijn. Om die reden zijn wij er van overtuigd dat het hierbij gaat om een toetsbare eenheid.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Binnen de KRW en het visstandbeheer zijn er doelen gesteld ten aanzien van de kwaliteit van de visstand. Om die te realiseren, voeren waterbeheerders/overheden kostbare maatregelen (verbetering van de waterkwaliteit, inrichtingsmaatregelen, maatregelen om de connectiviteit te verbeteren etc.) uit. Om te bepalen of deze doelen gehaald worden is onderzoek aan vispopulaties essentieel. Niet altijd is duidelijk waarom doelen niet gehaald worden. Hiervoor is vervolgens nader onderzoek naar de visstand noodzakelijk.

Het uiteindelijke doel van dit onderzoek is een diverse en gezonde visstand in Nederland.

De experimenten in dit project richten zich concreet op:

de aard en herkomst van populaties van soorten (genetische typering) en leeftijd van individuen binnen deze populaties in waterlichamen. Hiertoe worden een aantal, beperkt belastende, handelingen aan de vissen (gevangen binnen reguliere monitoring) uitgevoerd elk met een specifiek doel. De doelen hebben betrekking op het verkrijgen van inzicht in de populatiegrootte en –opbouw (soortensamenstelling), –structuur (aanwezige jaarklassen en leeftijd van individuen) en –herkomst (genetische samenstelling), aan de hand waarvan uiteindelijk effectieve maatregelen kunnen worden geformuleerd om de doelen vanuit de KRW, Natura2000 etc. dichterbij te brengen en te monitoren wat de effecten van deze maatregelen zijn.

Als voorbeeld: bij de herintroductie van de zalm in de Rijn en de Maas wordt uitzetmateriaal van diverse zalmstammen (Ätran (Zweden); Loire-Allier (Frankrijk), Burrishoole (Iers) etc.) gebruikt. Terugkerende dieren reproduceren onderling (al dan niet in gevangenschap), waarbij uiteindelijk het meest geschikte genotype overblijft. Het is noodzakelijk dit te monitoren om die ontwikkeling te kunnen volgen, maar ook om, wanneer er te weinig uitzetmateriaal is, de genetisch meest gelijkende stam te kunnen kiezen. Bij vangst in monitoringsprogramma's wordt hiertoe dan een klein stukje ( $\pm 3 \text{ mm}^2$ ) weefsel van een vin afgeknipt. [Voorheen werd hiervoor de vetvin gebruikt. Omdat recent onderzoek laat zien dat de vetvin van salmoniden mogelijk een functie heeft in het kader van de oriëntatie van de vis in snel stromend water en het mogelijk een secundair geslachtskenmerk is, wordt een klein stukje van de staartvin afgeknipt voor genetisch materiaal. Het voordeel is tevens dat 'normale' vinnen in een tijdsbestek van enkele weken weer aangroeien.](#)

### 3.3 Belang

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

Teneinde (kosten)effectieve maatregelen uit te voeren binnen de KRW, Natura 2000 en het Nederlands visstandbeheer is het noodzakelijk goed inzicht te hebben in de vispopulaties. Hiervoor is nodig dat de samenstelling en omvang van de vispopulatie, herkomst en leeftijdsopbouw in beeld is.

In wetenschappelijke zin levert dit onderzoek ook kennis op met betrekking tot de betreffende soorten en hun specifieke kenmerken. De resultaten van dit onderzoek worden vastgelegd in algemeen toegankelijke rapporten en in artikelen in wetenschappelijke tijdschriften.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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



Allereerst wordt op basis van rapporten, literatuur gekeken wat er al over het waterlichaam en de bijbehorende visstand bekend is. Binnen diverse monitoringsprogramma's (KRW operationele monitoring, toestand en trend monitoring en monitoring voor nader onderzoek, MWTL monitoring, monitoringsprogramma's voor trekvisserij etc.) worden vissen gevangen. Aangaande het schatten van de populatieomvang wordt voorafgaand bezien of het gebruik van de BOM (Bevist Oppervlak Methode) voldoende nauwkeurige resultaten kan opleveren voor de vraagstelling. Hierbij wordt de efficiëntie van een vangtuig, de omvang van de vangst en het beviste oppervlak van een waterlichaam gebruikt om tot een schatting van het visbestand te komen. Indien dit niet nauwkeurig genoeg is, kan vinknippen en de merk-terugvangst methode worden toegepast. Ook zijn er soms nadere onderzoeksvragen ten aanzien van leeftijdsopbouw, exacte bepaling van de populatieomvang van één soort of diverse soorten, genetische herkomst van soorten, migratiemogelijkheden tussen en binnen waterlichamen en bij kunstwerken waarvoor het ontnemen van een klein stukje weefsel noodzakelijk is. De leeftijd van individuele vissen kan worden vastgesteld aan de hand van een aantal schubben of een stukje van de vinstraat (vergelijkbaar met het tellen van de jaarringen van een boom). Hiervoor worden enkele schubben afgenomen of wordt (bij baarsachtigen) een stukje van de eerste vinstraat afgeknipt om in het lab met een binoculair de jaarringen te tellen. Na het ontnemen van het weefsel worden de vissen weer losgelaten en herstellen voorspoedig. Ook kunnen zo merk-terugvangst experimenten worden gedaan om populatiegrootte en migratie in beeld te brengen. Hiertoe wordt van een aantal vissen een klein stukje van de punt van een vin afgeknipt waardoor deze herkenbaar zijn bij terugvangst. Aan de hand hiervan kan de populatieomvang worden bepaald of kan worden vastgesteld of vissen langs een kunstwerk kunnen migreren. Binnen een paar weken groeit een vinpunt weer aan. Om de genetische herkomst van salmoniden vast te stellen wordt een stukje ( $\pm 3 \text{ mm}^2$ ) vin afgeknipt en opgeslagen in alcohol. Hierna wordt de vis weer losgelaten. In sommige gevallen kan het nodig zijn enkele vissen te doden, direct na vangst, om specifieke weefsels te ontnemen, zoals otolieten, opercula, maaginhouden en DNA materiaal (zelfstandig etende larvale en juveniele stadia voor genetische analyse).

In de eerste instantie formuleren opdrachtgevers de vragen die zij beantwoord willen zien met betrekking tot de visstand in het kader van genoemde monitoring. Omdat een en ander natuurlijk gepaard gaat met hogere kosten dan reguliere monitoring zullen zij een goede afweging maken voordat zij de vraag aan de opdrachtnemers gaan stellen. Via een offerte aanvraag bereikt de vraag dan de betrokken onderzoekers (dit gebeurt veelal in concurrentie met andere bureaus). De onderzoekers zullen vervolgens een inhoudelijke afweging maken of de gestelde vraag beantwoord kan worden met het nemen van weefsels van vissen. Indien het antwoord hierop bevestigend is, dan zal de onderzoeker een plan van aanpak (PvA) maken waarin de werkwijze exact omschreven zal worden. Onderdeel hiervan is een nauwkeurige afweging met betrekking tot de aantallen vissen die hiervoor noodzakelijk zijn (dit is tevens medebepalend voor de extra kosten en dus van belang uit concurrentie overwegingen). Het PvA wordt voorgelegd aan de IvD die vervolgens haar wettelijke taak zal verrichten, om te oordelen over het PvA, het welzijn van de proefdieren, de 3 V's, etc. om tot een eventuele verbetering van het PvA te komen. Indien het PvA is goedgekeurd, zal er een offerte met daarin de aanpak voor het onderzoek worden uitgebracht naar de opdrachtgever. Deze kiest dan (veelal op basis van EMVI-criteria) voor de meest voordelige variant, waarmee de onderzoeksvragen op kwalitatief voldoende wijze kunnen worden beantwoord. Wij realiseren ons dat de aanvraag ruim is omschreven, dit om tegemoet te kunnen komen aan de wensen van de opdrachtgevers, die op voorhand niet goed kunnen worden ingeschat. In de praktijk echter zal een zeer nauwkeurige afweging worden gemaakt ten aanzien van het aantal noodzakelijke vissen, waarmee een kwalitatief voldoende aanpak gerealiseerd kan worden tegen zo laag mogelijke kosten. Indien mogelijk, zal hierbij worden aangesloten bij bestaande protocollen, zoals in het Handboek Visstandbemonstering of in het Handboek Hydrobiologie.

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

1. Vangst van de vissen in/met:

- Schepnetten;
- Hok/schietfuisen;
- Zegens;
- Elektrovissers;
- Diverse typen kuilen (sleepnetvisserij).

2.a De handelingen aan levende vis (die vervolgens weer wordt losgelaten) betreffen:

- Vinknippen;
- Schubben trekken;
- Vinstralen knippen;
- Vinknip van de staartvin van salmoniden ten behoeve van DNA onderzoek.

2.b De handelingen aan direct na vangst gedode vis betreffen:

- Ontnemen van otolieten;
- Ontnemen van opercula;
- Ontnemen van maaginhouden;
- Overige DNA monsters verkrijgen aan de hand van zelfstandig etende larvale en juveniele vissen.

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

Als zodanig is er geen samenhang tussen de hier boven beschreven onderdelen. Afhankelijk van de onderzoeksvraag zal een bepaalde handeling worden uitgevoerd en weefsels worden genomen. Ook is er geen fasering in de uitvoering van de verschillende handelingen.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	<a href="#">Bijlage 1 AVD2120020171204</a> Het nemen van weefsels van <u>levende</u> vissen ten behoeve van onderzoek naar de visstand, gericht op het formuleren van beheersmaatregelen en het monitoren van de effecten hiervan.
2	<a href="#">Bijlage 2 AVD2120020171204</a> Het nemen van weefsels van <u>dode</u> vissen ten behoeve van onderzoek naar de visstand, gericht op het formuleren van beheersmaatregelen en het monitoren van de effecten hiervan.
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Bijlage Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	21200				
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	ATKB				
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.  <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td><a href="#">AVD2120020171204</a> Het nemen van weefsels van <u>levende</u> vissen ten behoeve van onderzoek naar de visstand, gericht op het formuleren van beheersmaatregelen en het monitoren van de effecten hiervan.</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	<a href="#">AVD2120020171204</a> Het nemen van weefsels van <u>levende</u> vissen ten behoeve van onderzoek naar de visstand, gericht op het formuleren van beheersmaatregelen en het monitoren van de effecten hiervan.
Volgnummer	Type dierproef				
1	<a href="#">AVD2120020171204</a> Het nemen van weefsels van <u>levende</u> vissen ten behoeve van onderzoek naar de visstand, gericht op het formuleren van beheersmaatregelen en het monitoren van de effecten hiervan.				

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Vissen worden gevangen binnen regulier monitoringsonderzoek (KRW, MWTL etc. ) met schepnetten, hok/schietfuisen, elektrovisserij, zegens en diverse typen kuilen. ATKB heeft een algemene ontheffing met betrekking tot de Flora en Faunawet en beschikt over alle noodzakelijke vergunningen en bevoegdheden. Weefsels worden genomen van levende vissen om inzicht te krijgen in specifieke aspecten van de visstand, zoals leeftijdsopbouw, conditie, exacte bepaling van de populatieomvang van één of meerdere vissoorten, genetische herkomst van soorten en migratiemogelijkheden tussen of binnen waterlichamen en bij kunstwerken. Na het nemen van de weefsels worden de vissen weer op de vangstlocatie losgelaten in goede gezondheid. In het laboratorium worden deze weefsels/monsters nader onderzocht zodat de leeftijd van de dieren kan worden vastgesteld (schubben trekken, vinstralen knippen), de populatieomvang en migratie kunnen worden bepaald middels merken en terugvangen (vinknippen) en DNA kan worden geanalyseerd zodat duidelijk wordt wat de genetische herkomst van de dieren is.

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

Vissen gevangen binnen de reguliere monitoring of ander visstandonderzoek worden licht geanestheiseerd, kortstondig uit het water genomen en op een natte meetplank gelegd. Met een pincet worden enkele schubben van de flank van de vis genomen of wordt een vinstraal of vinpunt afgeknipt. Bij salmoniden wordt een stukje van de vin (voor genetisch onderzoek) verwijderd ( $\pm 3 \text{ mm}^2$ ). De handeling duurt enkele seconden, waarna de vissen wederom in het water van herkomst worden uitgezet, wanneer zij voldoende zijn bijgekomen.

Voor schubben trekken, vinstralen knippen en vinknippen (ook DNA monsters) is sedatie vereist om de vissen handelbaar te maken en het ongerief te verminderen. Bij het schubben trekken van de meeste vissoorten zijn slechts een 5-tal schubben noodzakelijk. Bij het trekken van schubben van salmoniden worden tot maximaal 20 schubben getrokken. Door hun levenswijze in snel stromende wateren en stroomversnellingen en tijdens het paaien verliezen salmoniden in hun leven veel schubben die snel regenereren. Door deze regeneratie hebben de terug gegroeide schubben een amorfe kern, waarvan de jaarringen niet meer kunnen worden afgelezen. Hierbij is het dus noodzakelijk om meer schubben te nemen zodat voldoende leesbare exemplaren in het monster zitten.

Vinknippen verschilt van vinstralen knippen. Bij het vinknippen wordt een puntje van de staartvin afgeknipt om de vis bij terugvangst (gedurende enige tijd) herkenbaar te maken of om DNA te analyseren. Dit kleine stukje groeit snel terug. Bij het knippen van de vinstraal bij perciden wordt alleen de eerste harde vinstraal voor een stukje afgeknipt. Dit harde weefsel bevat (net als de schubben) jaarringen. In het lab wordt de doorsnede van de harde vinstraal gepolijst waarna de jaarringen zijn te tellen.

De dieren worden kortdurend opgeslagen in grote rechthoekige visteilen (inhoud 150 l). De bakken zijn afgedekt middels een rechthoekig deksel, waardoor de vissen in het schemerduister zitten en niet schrikken van bewegingen rondom de bakken. Het water in de bakken komt van dezelfde locatie waar de vissen zijn gevangen. Beluchting vindt plaats middels zuurstofpompjes, slangen en zuurstofsteentjes. Het water is hierdoor in beweging en bevat altijd voldoende zuurstof (tijdens opslag van een half uur wordt één keer het zuurstofgehalte gemeten). Het aantal vissen in een bak is afhankelijk van de grootte van de vis. Wanneer het grote vissen (bijvoorbeeld snoekbaarzen van 50-60 cm) betreft, dan worden hooguit enkele tot maximaal 5 vissen in één bak opgeslagen. Bij kleine vissen (bijvoorbeeld blankvoorns van 15-20 cm) dan worden er enkele tientallen in één bak opgeslagen. Na een periode van hooguit een half uur wordt beoordeeld of het zwemgedrag van de vissen normaal is en of de ademhaling normaal is (niet versneld). Wanneer dit het geval is, worden de vissen op de vangstlocatie losgelaten. Als dit nog niet het geval is, wordt de periode van opslag kortdurend verlengd totdat wel voldaan wordt aan genoemde criteria. Hierbij worden de vissen continu gemonitord.

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

In het handboek visstandbemonstering (STOWA, 2002), dat door alle waterbeheerders wordt gehanteerd om KRW monitoring uit te voeren, is vastgelegd dat de leeftijd moet worden bepaald van 3-5 vissen per lengte(jaar)klasse. Dit komt overeen met maximaal 50 vissen (10 jaarklassen in de vangst, 5 exemplaren per jaarklasse) per soort (schubben trekken, vinstraal knippen) per onderzoek. DNA van salmoniden heeft betrekking op 150 vissen per jaar, voor zover die allemaal gevangen kunnen worden.

## **B. De dieren**

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

In principe alle in de Nederlandse wateren voorkomende wilde vissoorten. Het is bij onderzoek naar de visstand in een waterlichaam niet mogelijk gekweekte dieren te gebruiken. Met betrekking tot salmoniden gaat het om maximaal 150 dieren per jaar, waarmee het totaal in 5 jaar op 750 vissen komt. Voor het overige valt het moeilijk in te schatten van hoeveel vissen weefselmonsters genomen moeten worden omdat dit afhankelijk is van de specifieke problematiek van het waterlichaam en de vraag van de waterbeheerder. Op basis van het onderzoek in de afgelopen jaren en het feit dat er vanuit regelgeving een tendens is naar meer monitoring wordt verwacht dat het maximaal 10.000 vissen betreft in de komende 5 jaar.

## **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

Per specifieke vraagstelling van een waterbeheerder zal worden afgewogen welke alternatieven er zijn om de betreffende vraag te beantwoorden. Vraagstellingen ten aanzien van de leeftijdsopbouw van populaties zullen in de eerste instantie getracht te worden beantwoord door een analyse van de lengte-frequentieverdelingen aan de hand van metingen aan levende vissen die daarna weer teug gezet worden. Alleen wanneer dit te onnauwkeurig zou blijken, door bijvoorbeeld te geringe vangsten, wordt besloten tot het verzamelen van weefsels van vissen. Voor analyse van de genetische herkomst van vissen bestaat geen alternatief (DNA fingerprinting). Door optimalisering van de bemonsteringsstrategie zal getracht worden het aantal vissen zo beperkt mogelijk te houden.

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

De levende vissen waarbij weefsel wordt ontnomen, zullen eerst licht worden gesedeerd (benzocaine 40 mg/) waarna de handeling wordt verricht. Nadat zij hiervan zijn herstelt, door blootstelling aan vers water, zullen zij worden losgelaten op de plek van vangst.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

N.V.T.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

Bij de dieren die direct na het vangen worden geanestheseerd en pas weer losgelaten worden als de anesthesie is uitgewerkt is geen sprake van verzorging. Dit duurt maximaal een half uur..

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

Niet van toepassing. Zie antwoord onder F.

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

Niet van toepassing. Zie antwoord onder F.

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De handelingen worden uitgevoerd onder lichte anesthesie, waarna de vissen worden losgelaten op het moment dat de verdoving is uitgewerkt en de vissen weer normaal gedrag vertonen. Na het loslaten is pijnbestrijding niet mogelijk.

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

### **I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen**

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Stress ten gevolgen van het vangen met diverse vangtuigen (opmerking: ze zouden anders ook gevangen zijn);  
Onder anesthesie gaan;  
Wakker worden uit anesthesie;  
Meten/handelingen buiten water;  
Enig vervolgongerief na het loslaten.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Zwemmen in het vangtuig, aanraking met het vangtuig, aanraking bij het hanteren van de vissen, uit het water gehaald worden.

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

Pijn en stress ten gevolge van de handelingen worden gereduceerd door toepassing van anesthesie. Verder, er wordt gewerkt met visvriendelijk knooploos netwerk, vissen worden gehanteerd met natte handen en de meetplank wordt voor gebruik nat gemaakt. De handelingen zullen zo snel als mogelijk worden uitgevoerd.

### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Het kan voorkomen dat vissen onbedoeld verwond worden wanneer deze op een ongelukkige wijze hard met delen van een vangtuig in aanraking komen. Wanneer dit leidt tot ernstige verwondingen zullen de vissen worden geëuthanaseerd met een hoge concentratie benzocaine (200 mg/l).

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

<1%

### **K. Classificatie van ongerief**

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

De inschatting van ongerief voor de levende vissen is licht. De verwondde vissen hebben **matig** ongerief maar worden snel geëuthanaseerd.

## **Einde experiment**

### **L. Wijze van doden**

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

Nee

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

.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	21200	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	ATKB	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.  <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	Volgnummer	Type dierproef
		2	<a href="#">AVD2120020171204</a> Het nemen van weefsels van <u>dode</u> vissen ten behoeve van onderzoek naar de visstand, gericht op het formuleren van beheersmaatregelen en het monitoren van de effecten hiervan.

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Vissen worden gevangen binnen regulier monitoringsonderzoek (KRW, MWTL etc.) of ander visstandonderzoek met schepnetten, hok/schietfuiken, zegens en diverse typen kuilen. ATKB heeft een algemene ontheffing met betrekking tot de Flora en Faunawet en beschikt over alle noodzakelijke vergunningen en bevoegdheden. Weefsels worden genomen van dode vissen om inzicht te krijgen in specifieke aspecten van de visstand, zoals leeftijdsopbouw, conditie en genetische herkomst van soorten. In het laboratorium worden deze weefsels/monsters nader onderzocht zodat de leeftijd van de dieren kan worden vastgesteld (nemen van otolieten en opercula bij vissen die geen jaarringen op de schubben vormen, of waarbij de schubben geen geschikt materiaal vormen om de leeftijd af te lezen (ctenoïde schubben)), maaginhoud kan worden vastgesteld waarmee bekend is wat de dieren eten en DNA kan worden geanalyseerd zodat duidelijk wordt wat de genetische herkomst van de dieren is.

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

Vissen worden gevangen binnen de reguliere monitoring of ander visstandonderzoek. Direct na vangst worden deze vissen gedood door middel van overdosering met benzocaine (200 mg/l). Van gedode vissen wordt in het laboratorium de otolieten, het operculum dan wel de maag verwijderd en nader onderzocht. Gedode zelfstandig etende larvale en juveniele stadia worden gebruikt om DNA te verzamelen en te analyseren. Het betreft hier mengmonsters van individuen die lastig op soort kunnen worden gebracht. Aan de hand van het aanwezige DNA kunnen soorten worden geïdentificeerd.



Overwogen is e-DNA bepalingen uit te voeren aan larvale en juveniele stadia. Hierbij is er ook contact geweest met instanties die e-DNA bepalingen voor ATKB uitvoeren. Problematisch is dat er met de larven en juvenielen altijd aanhangend water van de vangstlocatie meekomt. Dit water kan e-DNA bevatten van soorten die niet als larven in het monster aanwezig zijn, waarmee dan foutieve detecties worden gedaan. Besproken is de mogelijkheid om het larvenmonster te spoelen met water zonder e-DNA, waarna de vissen enige tijd in dit water moeten verblijven om zelf DNA af te kunnen scheiden. Met betrekking tot de uitvoerbaarheid en het welzijn van de larven is geoordeeld dat dit meer ongerief met zich mee zou brengen dan wanneer de larven direct worden gedood.

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

In het handboek visstandbemonstering (STOWA, 2002) is vastgelegd dat de leeftijd moet worden bepaald van 3-5 vissen per lengte(jaar)klasse. Dit komt overeen met een maximaal 50 vissen (10 jaarklassen in de vangst, 5 exemplaren per lengte(jaar)klasse) per soort (otolieten en opercula) per onderzoek. Voor de maaginhouden wordt ook uitgegaan van maximaal 50 vissen per soort om een betrouwbaar beeld van de voedselsamenstelling te kunnen krijgen. Voor DNA onderzoek voor overige soorten wordt uitgegaan van 200 monsters op jaarbasis, waarbij een monster zal bestaan uit enkele tientallen zelfstandig etende larven en juvenielen.

## **B. De dieren**

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

In principe alle in de Nederlandse wateren voorkomende wilde vissoorten. Het is bij onderzoek naar de visstand in een waterlichaam niet mogelijk gekweekte dieren te gebruiken. Het valt moeilijk in te schatten van hoeveel vissen weefselmonsters genomen moeten worden omdat dit afhankelijk is van de specifieke problematiek van het waterlichaam en de vraag van de waterbeheerder. Op basis van het onderzoek de afgelopen jaren en het feit dat er vanuit regelgeving een tendens is naar meer monitoring wordt verwacht dat het maximaal 25.000 vissen betreft in de komende 5 jaar. Het betreft hier voornamelijk zelfstandig etende larven en juvenielen, waarvan sowieso in de eerste weken van hun leven een sterfte optreedt van wel 99% of zelfs meer. Door compensatoire mechanismen (b.v. meer voedsel voor de overblijvers) is de overleving van jaar tot jaar redelijk stabiel.

## **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

Per specifieke vraagstelling van een waterbeheerder zal worden afgewogen welke alternatieven er zijn om de betreffende vraag te beantwoorden. Vraagstellingen ten aanzien van de leeftijdsopbouw van populaties zullen in de eerste instantie getracht te worden beantwoord door een analyse van de lengte-frequentieverdelingen aan levende vissen die daarna weer teruggezet worden. Alleen wanneer dit te onnauwkeurig zou blijken, wordt besloten tot het verzamelen van weefsels van vissen. Voor de analyse van maaginhouden is geen vervanging mogelijk. Door optimalisering van de bemonsteringsstrategie zal getracht worden het aantal vissen zo beperkt mogelijk te houden.

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

De gevangen vissen worden direct na vangst gedood door blootstelling aan een hoge concentratie benzocaine (200 mg/l).

---

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

N.V.T.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

Niet van toepassing. De vissen worden direct na vangst gedood. Er is dus geen sprake van huisvesting.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

Niet van toepassing. Zie antwoord onder F.

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

Niet van toepassing. Zie antwoord onder F.

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

X Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De vissen worden direct na vangst gedood door een overdosering van benzocaine.

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

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Stress ten gevolge van het vangen met diverse vangtuigen (opmerking: ze zouden anders ook gevangen zijn);

Uit het water halen;

Onder anesthesie gaan.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Zwemmen in het vangtuig, aanraking met het vangtuig, uit het water gehaald worden, blootstelling aan benzocaine.

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

Er wordt gewerkt met visvriendelijk knooploos netwerk, vissen worden gehanteerd met natte handen en zo snel als mogelijk geëuthanaseerd.

#### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

#### **K. Classificatie van ongerief**

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

De inschatting van ongerief voor de te doden vissen is licht.

### **Einde experiment**

#### **L. Wijze van doden**

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

Nee

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

De vissen worden gedood zodat in het laboratorium weefsels kunnen worden ontnomen.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



- Traject van besluitvorming bij aanvaarden opdracht in het kader van monitoring
  - Gebruik van voorgeschreven en wettelijk toegelaten vangmethodes en mogelijke conflicten van wetgeving.
  - Kans op predatie tijdens vangen
  - Betreffende diersoorten
  - Handelwijze bij vangen van exoten
  - Indicatie voor toepassen van sedatie/anesthesie
  - Indicatie voor knippen van vetvin (vervangen door minder belastend alternatief)
  - Huisvestingscondities na het vangen (t.b.v. bijkomen uit anesthesie)
  - Ongeriefdrempel bij toepassen humane eindpunten
  - Verzamelen eDNA bij larvale en juveniele stadia
  - Redactionele aspecten: Nader verduidelijken dan wel toespitsen van een aantal tekstpassages
- Datum antwoord: 04-04-2017
  - Verstrek(e) antwoord(en): Alle vragen/opmerkingen werden afdoende en overtuigend beantwoord en zijn verwerkt in de bijgestelde projectaanvraag.
  - De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

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

## **C. Beoordeling (inhoud)**

1. **Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld).**  
Vanuit de vereisten in het kader van de Europese Kaderrichtlijnwater (KRW), Natura2000 en het Nederlands visstand beheer is het noodzakelijk inzicht te krijgen in de visstand, en verbeterdoelstellingen ten aanzien hiervan.  
Deze monitoring wordt veelal uitgevoerd door Groene bureaus in opdracht van waterbeheerders (water- en hoogheemraadschappen) en overheden en bestaat uit het vangen, determineren en de lengte meten van vissen waarna de dieren direct weer losgelaten worden op de vanglocatie. Daarnaast kent deze monitoring een onderdeel gericht op het gericht vangen van bijzondere soorten en trekvisen, binnen eveneens internationale kaders.  
De standaard monitoring bevat geen handelingen die drempel overschrijdend ongerief met zich meebrengen en is dus niet vergunningplichtig in het kader van de Wod. In een aantal gevallen dienen echter andere dan de standaardmetingen te worden uitgevoerd. Binnen de KRW worden namelijk verschillende typen van monitoring onderscheiden, waarvan er een aantal toegesneden zijn op lokale en specifieke omstandigheden. Dan kan het bijvoorbeeld nodig zijn om maaginhouden te analyseren voor inzicht in het voedsel web, schubben te analyseren voor inzicht in de jaarklassen en weefselmonsters te nemen voor het bepalen van de genetische

samenstelling van een populatie (bijvoorbeeld bij Salmonidae). Dit betreft wel activiteiten die vergunningplichtig zijn op grond van de Wod.

Dit betreft zowel langlopende monitoringsactiviteiten als kleine kortdurende inventarisaties. In beide gevallen is het financieel en praktisch (tijdbestek) niet haalbaar om voor iedere opdracht een aparte projectvergunning aan te vragen. Het betreft in alle gevallen zeer gestandaardiseerde handelingen waarvan de ongeriefconsequenties voor de verschillende soorten vergelijkbaar en goed in te schatten zijn. De commissie acht de overwegingen op basis waarvan door de instelling besloten is in dit project al deze additionele monitoring activiteiten op te nemen valide en acht het belang van een integrale strategie groot. Het nu voorgestelde aggregatieniveau biedt uitzicht op een situatie waarin waterbeheerders en overheden over wetenschappelijk onderbouwde informatie over vispopulaties in hun habitat kunnen beschikken en hoe deze op basis hiervan optimaal zouden kunnen worden beschermd. Beheersmaatregelen die niet steunen op gedegen onderzoek zouden schade kunnen betekenen voor de doelsoort (en mogelijk andere soorten) in het specifieke leefgebied en het niet meer kunnen voldoen aan de wettelijke monitoringseisen.

De aanvraag heeft een duidelijke doelstelling en samenhang en kan daarom gekarakteriseerd worden als een project. De DEC is er van overtuigd dat gedurende de looptijd van het project de instelling op zorgvuldige wijze omgaat met de onder dit project uit te voeren onderzoeksopdrachten en dat er niet onnodig dieren zullen worden gebruikt. Over de uitkomsten van deze studies zal in het publieke domein worden gerapporteerd.

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

De instelling beschikt over alle ontheffingen in het kader van de Wet Natuurbescherming en de Visserijwet. Er is geen sprake van tegenstrijdige wetgeving met consequenties voor het ongerief van de dieren en het verloop van het experiment.

3. **Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.**

De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

### **Belangen en waarden**

4. **Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).**

Het uiteindelijke doel is het voldoen aan de in de KRW gestelde doelen ten behoeve van de kwaliteit van de visstand in Nederland. Binnen dit uiteindelijke doel zijn een aantal concrete doelen te onderscheiden:

1. het verkrijgen van inzicht in de populatiegrootte
2. het verkrijgen van inzicht in de populatieopbouw (soortensamenstelling), populatiestructuur (aanwezige jaarklassen en leeftijd van individuen)

3. het verkrijgen van inzicht in de herkomst van de dieren (genetische samenstelling, bijvoorbeeld bij de herintroductie van verschillende zalmstammen in de Rijn en Maas),

Aan de hand hiervan worden uiteindelijk maatregelen geformuleerd om de doelen vanuit de KRW, Natura2000 etc. dichterbij te brengen en te monitoren wat de effecten van deze maatregelen zijn.

De DEC is van oordeel dat er een directe en reële relatie bestaat tussen de directe concrete doelen en het uiteindelijke doel. Zij is bovendien van mening dat zowel de uiteindelijke doelen als de directe doelen maatschappelijk en wetenschappelijk relevant zijn, zowel in bredere zin als binnen het betreffende onderzoeksveld, en daarmee het directe doel van het onderzoek gerechtvaardigd is.

De instelling heeft veel ervaring met dit type onderzoek. Het is aannemelijk dat de resultaten uit de experimenten beschreven in deze project een substantiële bijdrage zullen leveren aan het behalen van de uiteindelijke doelstelling.

5. **Benoeem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld)**

De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de dieren die in het onderzoek betrokken worden, de diersoort(en), de opdrachtgevers, waterbeheerders, de eisen stellende overheid, het onderzoeksveld en de onderzoekers.

Voor de dieren geldt dat door het nemen van weefselmonsters, het kortdurend houden in gevangenschap en/of doden hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.

De uiteindelijke uitkomsten van dit onderzoek zijn van belang voor de bescherming van de betreffende vissoorten en visstandbeheer in bredere zin. Behoud van soorten en biodiversiteit zijn belangrijke waarden binnen het natuurbeheer.

Het belang van de opdrachtgevers is dat zij de beschikking krijgen over onderbouwde beheers voorstellen, waarmee invulling kan worden gegeven aan de wettelijke en internationale verplichtingen rond de bescherming van de visstand in Nederland.

Voor de wetenschap is het belang dat de resultaten toegankelijk worden voor een zo groot mogelijk onderzoeksveld en daarom gepubliceerd worden en uitgedragen worden op congressen, en in sommige gevallen ook voor een breder publiek.

Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van wetenschappelijke inzichten een bijdrage levert aan hun wetenschappelijke reputatie en status.

Carrièremogelijkheden en status kunnen door de onderzoekers zelf van belang geacht worden, maar dienen naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of het onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (belang voor visstand, milieu, kennis).

6. **Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wet- en regelgeving op het gebied van het omgaan met voor het milieu risicovolle stoffen of organismen.**

De commissie is van oordeel dat er ten gevolge van de in dit project beschreven dierproeven geen sprake is van substantiële negatieve milieueffecten.

### **Proefopzet en haalbaarheid**

7. **Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5).**

De instelling heeft al vele jaren ervaring met het vangen en de analyse van in het wild levende vissen. Een groot gedeelte van dit onderzoek valt buiten de kaders van de Wet op de Dierproeven.

8. **Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6).**

De experimenten sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De kennis en ervaring binnen de instelling (onderzoekers en IvD) bieden uitzicht op het behalen van deze doelstellingen, met zo min mogelijk belasting voor de betrokken dieren.

De indieners hebben duidelijk gemaakt dat zij op een verantwoorde wijze omgaan met de ruimte die een breed opgezet project als dit hen biedt.

### **Welzijn dieren**

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

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

Er is sprake van onderzoek met wilde dieren in hun biotoop. De betreffende dieren representeren de doelsoorten van het onderzoek. De uiteindelijke en directe doelstellingen van het onderzoek kunnen niet op een andere wijze (bijvoorbeeld met gehouden soortgenoten) worden onderzocht. De keuze voor de diersoorten wordt bepaald door de vragen vanuit de opdrachtgevers. De instelling zorgt ervoor dat deze altijd aansluiten bij hun eigen kennis en deskundigheid.

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

Er is geen sprake van langdurige huisvesting (>24 uur) van de dieren. De dieren



worden in het wild gevangen en in veel gevallen vrijwel direct na de metingen/handelingen weer vrijgelaten.

Dieren die voor het uitvoeren van de handelingen onder anesthesie worden gebracht worden maximaal enig uren gehuisvest in bakken met water uit het biotoop.

Er zal in dit soort gevallen voor worden gezorgd dat aan alle eisen vanuit de Wod met betrekking tot huisvesting en verzorging van de dieren en de bevoegdheid en deskundigheid van de betrokken medewerkers zal worden voldaan. De vissen worden losgelaten op het moment dat de verdoving is uitgewerkt en zij weer normaal gedrag vertonen.

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

Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Voor meer dan 99% van de dieren wordt het ongerief geclassificeerd als licht (het vangen en onder lichte sedatie trekken van schubben, vinstralen knippen, vinknippen of het direct doden na het vangen). Onbedoeld zullen bij minder dan 1% van de vissen door het vangen beschadigingen op kunnen treden resulterend in matig ongerief. Deze dieren zullen direct na het vangen worden geëuthanaseerd. Deze inschattingen zijn gebaseerd op uitgebreide ervaring met dit soort proeven.

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

De integriteit van de dieren wordt aangetast door het instrumentele gebruik (het merken, het doden voor het verzamelen van organen/weefsels, een tijdelijke of permanente wijziging van het uiterlijk en eventueel het huisvesten van wilde dieren in gevangenschap).

Er zullen onder dit project nooit vissen speciaal gevangen worden om de in dit project beschreven dierproeven te kunnen uitvoeren. Het betreft in alle gevallen dieren die in het kader van de reguliere monitoring toch ook al gevangen worden.

13. **Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).**

De criteria voor humane eindpunten zijn primair gericht op het voorkomen van onnodig en te veel ongerief bij de betrokken dieren. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is klein (<1%). De oorzaak hiervan zal vooral zijn het gewond raken door het vangtuig of door de vanghandelingen.

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

De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat mogelijke verfijnings- en verminderingsalternatieven worden toegepast. Er zijn geen diervervangende methoden beschikbaar voor het bereiken van de gestelde doelen. Het betreft onderzoek aan de doelsoorten.

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

De geschatte aantallen dieren per onderzoek zijn gebaseerd op de jarenlange ervaring van de instelling. De totale aantallen zijn ingeschat op basis van de

onderzoeksactiviteiten van de laatste jaren. Er is rekening gehouden met de omstandigheid dat er vanuit regelgeving een tendens is naar meer monitoring.

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

De uitvoering van de in dit project beschreven experimenten is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven.

Er wordt gebruik gemaakt van voor de betreffende soorten toegelaten vangmethoden en zo min mogelijke belastende wijzen van merken ten behoeve van de vang/terugvang strategie voor het schatten van de omvang van de verschillende vispopulaties.

17. **Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe.**

Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek zoals bedoeld in de Wet. Het onderzoek dient echter wel om invulling te kunnen geven aan verplichtingen die voortkomen uit een Europese Richtlijn (KRW). De instelling ziet erop toe dat er geen onnodige duplicering van onderzoek plaatsvindt.

18. **Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld).**

Er is geen voorkeur voor mannelijke of vrouwelijke dieren.

19. **Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).**

Een deel van de dieren wordt in het kader van het project gedood. Dit is enerzijds omdat het verzamelen van organen onderdeel is van de doelstellingen anderzijds, in het geval van de analyse van de maaginhouden, omdat het alternatief (maagspoelen) voor het dier veel riskanter en belastender is.

20. **Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.**

Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gedood om niet-wetenschappelijke redenen.

**NTS**

21. **Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?**

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

## **D. Ethische afweging**

1. **Benoem de centrale morele vraag (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A).**

Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project de aantasting van de integriteit en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is tegemoet gekomen aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's)?

2. **Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van **gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel**.**

Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden).

De dieren zullen, afgezien van het vangen, met niet meer dan gering ongerief of in een beperkt aantal gevallen (toepassen van anesthesie) met matig ongerief worden geconfronteerd. De doelstellingen kunnen niet zonder het gebruik van de doeldieren behaald worden. De onderzoekers hebben alle maatregelen en voorzorgen genomen om onnodig lijden van de dieren te voorkomen en het aantal dieren te beperken.

De commissie heeft de aantasting van de integriteit (wilde dieren die gedood, extern gemerkt of een korte periode in gevangenschap gehouden worden) in haar afweging betrokken.

Tegenover het confronteren van een relatief beperkt aantal dieren met een aantasting van hun welzijn en integriteit staat de verwachting dat de uitkomsten van het onderzoek voordeel zullen opleveren voor een grote groep soortgenoten en andere soorten op de betreffende locaties.

Voor de waterbeheerders en overheden is het belangrijk dat zij op wetenschappelijke onderbouwde wijze invulling kunnen geven aan de wettelijke verplichting rond de bescherming van de visstand en bepalen van de effecten van de door hen genomen maatregelen.

Met het uitvoeren van een relatief klein aantal dierproeven kan veel wetenschappelijke informatie met betrekking tot de soort en de habitat worden verkregen. Dit wordt samengevoegd met de resultaten uit parallel uitgevoerd

onderzoek dat buiten de kaders van de Wod valt.

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

De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling. Naast fundamenteel wetenschappelijke kennis met betrekking tot de betreffende soorten is het de verwachting dat de resultaten uit dit onderzoek een bijdrage zullen leveren aan het formuleren van beschermingsmaatregelen voor de betreffende soorten en mogelijk andere soorten op de te onderzoeken locaties.

De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het onderzoek en de uitvoering hiervan. De DEC is van mening dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstellingen binnen de looptijd van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat voorkomen wordt dat mens, dier en milieu, significante onbedoelde negatieve effecten zullen ondervinden als gevolg van de dierproeven.

De keuze voor het gebruik van in het wild gevangen dieren en uitvoering buiten het laboratorium is voldoende wetenschappelijk onderbouwd. De doelstellingen zijn direct gericht op de doelsoorten in hun biotoop.

De DEC is van mening dat het maatschappelijke en wetenschappelijke belang voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (het gevrijwaard blijven van een aantasting van welzijn en integriteit) moreel te rechtvaardigen.

De commissie acht het dan ook moreel gerechtvaardigd om een relatief zeer klein gedeelte van de natuurlijke populatie te vangen en voor weinig belastende dierproeven in te zetten.

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus

14 juli 2016

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd - zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



**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:**

28 april 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD2120020171204

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur





**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:**

28 april 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD2120020171204

**Over uw project**

Geplande startdatum:

1 mei 2017

Geplande einddatum:

1 mei 2022

Titel project:

AVD2120020171204 Het nemen van weefsels van vissen ten behoeve van onderzoek naar de visstand, gericht op het formuleren van beheersmaatregelen en het monitoren van de effecten hiervan.

Titel niet-technische samenvatting:

AVD2120020171204 Het nemen van weefsels van vissen ten behoeve van onderzoek naar de visstand, gericht op het formuleren van beheersmaatregelen en het monitorren van de effecten hiervan.

Naam DEC:

[REDACTED]

E-mailadres DEC:

[REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen:

€ 1.287,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:

[REDACTED]

Functie:

Senior specialistisch adviseur

Plaats:

Geldermalsen

Datum:

4 april 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

ATKB

Poppenbouwing 34  
4191 NZ GELDERMALEN



**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  
AVD2120020171204

**Bijlagen**

2

Datum 28 april 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 28 april 2017  
Vervaldatum: 28 mei 2017  
Factuurnummer: 171204

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD2120020171204	€ 1.287,00

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



verwacht u in ieder geval veel te zullen gebruiken?

Kunt u ook aangeven hoeveel dieren van welke soort u (ongeveer) zult gaan gebruiken, in aantal of procentueel? Bijvoorbeeld op basis van ervaringen uit het verleden.

Kunt u de vangstmethodes beschrijven?

**Datum:**

16 mei 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD2120020171204

### **Leges**

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

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

### **Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuur 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. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

### **Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlagen:

- Melding bijlagen



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	21200	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	ATKB	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	1	AVD2120020171204 Het nemen van weefsels van <u>levende</u> vissen ten behoeve van onderzoek naar de visstand, gericht op het formuleren van beheersmaatregelen en het monitoren van de effecten hiervan.

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Vissen worden gevangen binnen regulier monitoringsonderzoek (KRW, MWTL etc. ) met schepnetten, hok/schietfuisen, elektrovisserij, zegens en diverse typen kuilen. Er wordt hierbij vanuit de boot gevestig met sleepnetten (kuilen), van af de oever met zegens en elektrovisserij en vanaf vaste fuikplaatsen langs de oever en met schietfuisen op het open water. ATKB heeft een algemene ontheffing met betrekking tot de Flora en Faunawet en beschikt over alle noodzakelijke vergunningen en bevoegdheden. Weefsels worden genomen van levende vissen (het betreft hier voornamelijk de volgende vissoorten: alver, blankvoorn, brasem, kolblei, karper, winde, ruisvoorn, zeelt, barbeel, kopvoorn, serpeling, sneep, riviergrondel, baars, snoek, snoekbaars, houting, beekforel, zeeforel, zalm, rivierprik, zee-prik en aal) om inzicht te krijgen in specifieke aspecten van de visstand, zoals leeftijdsopbouw, conditie, exacte bepaling van de populatieomvang van één of meerdere vissoorten, genetische herkomst van soorten en migratiemogelijkheden tussen of binnen waterlichamen en bij kunstwerken. Na het nemen van de weefsels worden de vissen weer op de vangstlocatie losgelaten in goede gezondheid. In het laboratorium worden deze weefsels/monsters nader onderzocht zodat de leeftijd van de dieren kan worden vastgesteld (schubben trekken, vinstralen knippen), de populatieomvang en migratie kunnen worden bepaald middels merken en terugvangen (vinknippen) en DNA kan worden geanalyseerd zodat duidelijk wordt wat de genetische herkomst van de dieren is.

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

Vissen gevangen binnen de reguliere monitoring of ander visstandonderzoek worden licht geanestheseerd, kortstondig uit het water genomen en op een natte meetplank gelegd. Met een pincet worden enkele schubben van de flank van de vis genomen of wordt een vinstraal of vinpunt afgeknipt. Bij salmoniden wordt een stukje van de vin (voor genetisch onderzoek) verwijderd ( $\pm 3 \text{ mm}^2$ ). De handeling duurt enkele seconden, waarna de vissen wederom in het water van herkomst worden uitgezet, wanneer zij voldoende zijn bijgekomen.

Voor schubben trekken, vinstralen knippen en vinknippen (ook DNA monsters) is sedatie vereist om de vissen handelbaar te maken en het ongerief te verminderen. Bij het schubben trekken van de meeste vissoorten zijn slechts een 5-tal schubben noodzakelijk. Bij het trekken van schubben van salmoniden worden tot maximaal 20 schubben getrokken. Door hun levenswijze in snel stromende wateren en stroomversnellingen en tijdens het paaien verliezen salmoniden in hun leven veel schubben die snel regenereren. Door deze regeneratie hebben de terug gegroeide schubben een amorfe kern, waarvan de jaarringen niet meer kunnen worden afgelezen. Hierbij is het dus noodzakelijk om meer schubben te nemen zodat voldoende leesbare exemplaren in het monster zitten.

Vinknippen verschilt van vinstralen knippen. Bij het vinknippen wordt een puntje van de staartvin afgeknipt om de vis bij terugvangst (gedurende enige tijd) herkenbaar te maken of om DNA te analyseren. Dit kleine stukje groeit snel terug. Bij het knippen van de vinstraal bij perciden wordt alleen de eerste harde vinstraal voor een stukje afgeknipt. Dit harde weefsel bevat (net als de schubben) jaarringen. In het lab wordt de doorsnede van de harde vinstraal gepolijst waarna de jaarringen zijn te tellen.

De dieren worden kortdurend opgeslagen in grote rechthoekige visteilen (inhoud 150 l). De bakken zijn afgedekt middels een rechthoekig deksel, waardoor de vissen in het schemerduister zitten en niet schrikken van bewegingen rondom de bakken. Het water in de bakken komt van dezelfde locatie waar de vissen zijn gevangen. Beluchting vindt plaats middels zuurstofpompjes, slangen en zuurstofsteentjes. Het water is hierdoor in beweging en bevat altijd voldoende zuurstof (tijdens opslag van een half uur wordt één keer het zuurstofgehalte gemeten). Het aantal vissen in een bak is afhankelijk van de grootte van de vis. Wanneer het grote vissen (bijvoorbeeld snoekbaarzen van 50-60 cm) betreft, dan worden hooguit enkele tot maximaal 5 vissen in één bak opgeslagen. Bij kleine vissen (bijvoorbeeld blankvoorns van 15-20 cm) dan worden er enkele tientallen in één bak opgeslagen. Na een periode van hooguit een half uur wordt beoordeeld of het zwemgedrag van de vissen normaal is en of de ademhaling normaal is (niet versneld). Wanneer dit het geval is, worden de vissen op de vangstlocatie losgelaten. Als dit nog niet het geval is, wordt de periode van opslag kortdurend verlengd totdat wel voldaan wordt aan genoemde criteria. Hierbij worden de vissen continu gemonitord.

---

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

---

In het handboek visstandbemonstering (STOWA, 2002), dat door alle waterbeheerders wordt gehanteerd om KRW monitoring uit te voeren, is vastgelegd dat de leeftijd moet worden bepaald van 3-5 vissen per lengte(jaar)klasse. Dit komt overeen met maximaal 50 vissen (10 jaarklassen in de vangst, 5 exemplaren per jaarklasse) per soort (schubben trekken, vinstraal knippen) per onderzoek. DNA van salmoniden heeft betrekking op 150 vissen per jaar, voor zover die allemaal gevangen kunnen worden.

---

## **B. De dieren**

---

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

---

In principe alle in de Nederlandse wateren voorkomende wilde vissoorten. Het is bij onderzoek naar de visstand in een waterlichaam niet mogelijk gekweekte dieren te gebruiken. **Met betrekking tot salmoniden gaat het om maximaal 150 dieren per jaar, waarmee het totaal in 5 jaar op 750 vissen komt.** Voor het overige valt het moeilijk in te schatten van hoeveel vissen weefselmonsters genomen moeten worden omdat dit afhankelijk is van de specifieke problematiek van het waterlichaam en de vraag van de waterbeheerder. Op basis van het onderzoek in de afgelopen jaren en het feit dat er vanuit regelgeving een tendens is naar meer monitoring wordt verwacht dat het maximaal 10.000 vissen betreft in de komende 5 jaar. **Het betreft hier voornamelijk de algemeen voorkomende vissoorten: alver, blankvoorn, brasem, kolblei, karper, winde, ruisvoorn, zeelt, riviergrondel, baars, snoek, snoekbaars en aal.** Op basis van eerdere ervaringen gaat het hier om ongeveer 90% van de maximaal te gebruiken vissoorten. **Relatief weinig voorkomende vissoorten zoals barbeel, kopvoorn, serpeling, sneep, houting, rivierprik, zeebek worden minder gebruikt (10% van de maximaal te gebruiken aantallen).** **Opgemerkt dient te worden dat aantallen vissoorten afhangen van de te**

---

beantwoorden vraagstellingen van de beheerders. Op voorhand is onduidelijk hoeveel vraag er zal zijn. De genoemde aantallen zijn gebaseerd op hetgeen maximaal te verwachten is.

### **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

Per specifieke vraagstelling van een waterbeheerder zal worden afgewogen welke alternatieven er zijn om de betreffende vraag te beantwoorden. Vraagstellingen ten aanzien van de leeftijdsopbouw van populaties zullen in de eerste instantie getracht te worden beantwoord door een analyse van de lengte-frequentieverdelingen aan de hand van metingen aan levende vissen die daarna weer teug gezet worden. Alleen wanneer dit te onnauwkeurig zou blijken, door bijvoorbeeld te geringe vangsten, wordt besloten tot het verzamelen van weefsels van vissen. Voor analyse van de genetische herkomst van vissen bestaat geen alternatief (DNA fingerprinting). Door optimalisering van de bemonsteringsstrategie zal getracht worden het aantal vissen zo beperkt mogelijk te houden.

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

De levende vissen waarbij weefsel wordt ontnomen, zullen eerst licht worden gesedeerd (benzocaine 40 mg/) waarna de handeling wordt verricht. Nadat zij hiervan zijn herstelt, door blootstelling aan vers water, zullen zij worden losgelaten op de plek van vangst.

## **Herhaling en duplicering**

### **E. Herhaling**

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

N.V.T.

## **Huisvesting en verzorging**

### **F. Huisvesting en verzorging**

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

Nee

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

Bij de dieren die direct na het vangen worden geanestheseerd en pas weer losgelaten worden als de anesthesie is uitgewerkt is geen sprake van verzorging. Dit duurt maximaal een half uur..

### **G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest**

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

Niet van toepassing. Zie antwoord onder F.

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

Niet van toepassing. Zie antwoord onder F.

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

X Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De handelingen worden uitgevoerd onder lichte anesthesie, waarna de vissen worden losgelaten op het moment dat de verdoving is uitgewerkt en de vissen weer normaal gedrag vertonen. Na het loslaten is pijnbestrijding niet mogelijk.

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

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Stress ten gevolgen van het vangen met diverse vangtuigen (opmerking: ze zouden anders ook gevangen zijn);

Onder anesthesie gaan;

Wakker worden uit anesthesie;

Meten/handelingen buiten water;

Enig vervolgongerief na het loslaten.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Zwemmen in het vangtuig, aanraking met het vangtuig, aanraking bij het hanteren van de vissen, uit het water gehaald worden.

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

Pijn en stress ten gevolge van de handelingen worden gereduceerd door toepassing van anesthesie. Verder, er wordt gewerkt met visvriendelijk knooploos netwerk, vissen worden gehanteerd met natte handen en de meetplank wordt voor gebruik nat gemaakt. De handelingen zullen zo snel als mogelijk worden uitgevoerd.

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Het kan voorkomen dat vissen onbedoeld verwond worden wanneer deze op een ongelukkige wijze hard met delen van een vangtuig in aanraking komen. Wanneer dit leidt tot ernstige verwondingen zullen de vissen worden geëuthanaseerd met een hoge concentratie benzocaine (200 mg/l).

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

<1%



### K. Classificatie van ongerief

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

De inschatting van ongerief voor de levende vissen is licht. De verwondde vissen hebben matig ongerief maar worden snel geëuthanaseerd.

### Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	21200	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	ATKB	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.  <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	Volgnummer	Type dierproef
		2	AVD2120020171204 Het nemen van weefsels van <u>dode</u> vissen ten behoeve van onderzoek naar de visstand, gericht op het formuleren van beheersmaatregelen en het monitoren van de effecten hiervan.

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Vissen worden gevangen binnen regulier monitoringsonderzoek (KRW, MWTL etc.) of ander visstandonderzoek met schepnetten, hok/schietfuisen, zegens en diverse typen kuilen. Er wordt hierbij vanuit de boot gevist met sleepnetten (kuilen), van af de oever met zegens en elektrovisserij en vanaf vaste fuikplaatsen langs de oever en met schietfuisen op het open water. ATKB heeft een algemene ontheffing met betrekking tot de Flora en Faunawet en beschikt over alle noodzakelijke vergunningen en bevoegdheden. Weefsels worden genomen van dode vissen(het betreft hier voornamelijk de volgende vissoorten: alver, blankvoorn, brasem, kolblei, karper, winde, ruisvoorn, zeelt, barbeel, kopvoorn, serpeling, sneep, riviergrondel, baars, snoek, snoekbaars, houting, beekforel, zeeforel, zalm, rivierprik, zeebek en aal) om inzicht te krijgen in specifieke aspecten van de visstand, zoals leeftijdsopbouw, conditie en genetische herkomst van soorten. In het laboratorium worden deze weefsels/monsters nader onderzocht zodat de leeftijd van de dieren kan worden vastgesteld (nemen van otolieten en opercula bij vissen die geen jaarringen op de schubben vormen, of waarbij de schubben geen geschikt materiaal vormen om de leeftijd af te lezen (ctenoide schubben)), maaginhoud kan worden vastgesteld waarmee bekend is wat de dieren eten en DNA kan worden geanalyseerd zodat duidelijk wordt wat de genetische herkomst van de dieren is.

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

Vissen worden gevangen binnen de reguliere monitoring of ander visstandonderzoek. Direct na vangst worden deze vissen gedood door middel van overdosering met benzocaine (200 mg/l). Van gedode vissen wordt in het laboratorium de otolieten, het operculum dan wel de maag verwijderd en nader onderzocht.

Gedode zelfstandig etende larvale en juveniele stadia worden gebruikt om DNA te verzamelen en te analyseren. Het betreft hier mengmonsters van individuen die lastig op soort kunnen worden gebracht. Aan de hand van het aanwezige DNA kunnen soorten worden geïdentificeerd.

Overwogen is e-DNA bepalingen uit te voeren aan larvale en juveniele stadia. Hierbij is er ook contact geweest met instanties die e-DNA bepalingen voor ATKB uitvoeren. Problematisch is dat er met de larven en juvenielen altijd aanhangend water van de vangstlocatie meekomt. Dit water kan e-DNA bevatten van soorten die niet als larven in het monster aanwezig zijn, waarmee dan foutieve detecties worden gedaan. Besproken is de mogelijkheid om het larvenmonster te spoelen met water zonder e-DNA, waarna de vissen enige tijd in dit water moeten verblijven om zelf DNA af te kunnen scheiden. Met betrekking tot de uitvoerbaarheid en het welzijn van de larven is geoordeeld dat dit meer ongerief met zich mee zou brengen dan wanneer de larven direct worden gedood.

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

In het handboek visstandbemonstering (STOWA, 2002) is vastgelegd dat de leeftijd moet worden bepaald van 3-5 vissen per lengte(jaar)klasse. Dit komt overeen met een maximaal 50 vissen (10 jaarklassen in de vangst, 5 exemplaren per lengte(jaar)klasse) per soort (otolieten en opercula) per onderzoek. Voor de maaginhouden wordt ook uitgegaan van maximaal 50 vissen per soort om een betrouwbaar beeld van de voedselsamenstelling te kunnen krijgen. Voor DNA onderzoek voor overige soorten wordt uitgegaan van 200 monsters op jaarbasis, waarbij een monster zal bestaan uit enkele tientallen zelfstandig etende larven en juvenielen.

## **B. De dieren**

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

In principe alle in de Nederlandse wateren voorkomende wilde vissoorten (het betreft hier voornamelijk de volgende vissoorten: alver, blankvoorn, brasem, kolblei, karper, winde, ruisvoorn, zeelt, barbeel, kopvoorn, serpeling, sneep, riviergrondel, baars, snoek, snoekbaars, houting, beekforel, zeeforel, zalm, rivierprik, zeebek en aal). Het is bij onderzoek naar de visstand in een waterlichaam niet mogelijk gekweekte dieren te gebruiken. Het valt moeilijk in te schatten van hoeveel vissen weefselmonsters genomen moeten worden omdat dit afhankelijk is van de specifieke problematiek van het waterlichaam en de vraag van de waterbeheerder. Op basis van het onderzoek de afgelopen jaren en het feit dat er vanuit regelgeving een tendens is naar meer monitoring wordt verwacht dat het maximaal 25.000 vissen betreft in de komende 5 jaar. De algemeen voorkomende vissoorten zullen veruit het meest gebruikt worden (alver, blankvoorn, brasem, kolblei, karper, winde, ruisvoorn, zeelt, riviergrondel, baars, snoek, snoekbaars en aal, naar verwachting 90% van het totaal). Minder algemeen voorkomende soorten (zoals barbeel, kopvoorn, serpeling, sneep, houting, rivierprik, zeebek) zullen ook minder worden gebruikt omdat deze in visstandbemonsteringen niet zoveel aangetroffen worden (10% van het totaal aantal te gebruiken vissen). Het betreft hier voornamelijk zelfstandig etende larven en juvenielen, waarvan sowieso in de eerste weken van hun leven een sterfte optreedt van wel 99% of zelfs meer. Door compensatoire mechanismen (b.v. meer voedsel voor de overblijvers) is de overleving van jaar tot jaar redelijk stabiel.

## **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

Per specifieke vraagstelling van een waterbeheerder zal worden afgewogen welke alternatieven er zijn om de betreffende vraag te beantwoorden. Vraagstellingen ten aanzien van de leeftijdsopbouw van populaties zullen in de eerste instantie getracht te worden beantwoord door een analyse van de lengte-frequentieverdelingen aan levende vissen die daarna weer teruggezet worden. Alleen wanneer dit te onnauwkeurig zou blijken, wordt besloten tot het verzamelen van weefsels van vissen. Voor de analyse van maaginhoud is geen vervanging mogelijk. Door optimalisering van de bemonsteringsstrategie zal getracht worden het aantal vissen zo beperkt mogelijk te houden.

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

De gevangen vissen worden direct na vangst gedood door blootstelling aan een hoge concentratie benzocaine (200 mg/l).

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

N.V.T.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

Niet van toepassing. De vissen worden direct na vangst gedood. Er is dus geen sprake van huisvesting.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

Niet van toepassing. Zie antwoord onder F.

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

Niet van toepassing. Zie antwoord onder F.

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

X Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De vissen worden direct na vangst gedood door een overdosering van benzocaine.

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

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Stress ten gevolge van het vangen met diverse vangtuigen (opmerking: ze zouden anders ook gevangen zijn);  
Uit het water halen;  
Onder anesthesie gaan.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Zwemmen in het vangtuig, aanraking met het vangtuig, uit het water gehaald worden, blootstelling aan benzocaine.

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

Er wordt gewerkt met visvriendelijk knooploos netwerk, vissen worden gehanteerd met natte handen en zo snel als mogelijk geëuthanaseerd.

### J. Humane eindpunten

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

X Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

### K. Classificatie van ongerief

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

De inschatting van ongerief voor de te doden vissen is licht.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

De vissen worden gedood zodat in het laboratorium weefsels kunnen worden ontnomen.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

X Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

ATKB

Poppenbouwing 34  
4191 NZ GELDERMALSEN  


**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  
AVD2120020171204  
**Bijlagen**  
1

Datum 6 juni 2017  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer 

Op 26 april 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het nemen van weefsels van vissen ten behoeve van onderzoek naar de visstand, gericht op het formuleren van beheersmaatregelen en het monitoren van de effecten hiervan." met aanvraagnummer AVD2120020171204. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 22 mei 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof een nauwkeurigere beschrijving van de diersoorten, het aantal dieren en de vangstmethodes. Hierop is ook de NTS aangepast.

#### **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 "Het nemen van weefsels van vissen ten behoeve van onderzoek naar de visstand, gericht op het formuleren van beheersmaatregelen en het monitoren van de effecten hiervan." starten. De vergunning wordt afgegeven van 6 juni 2017 tot en met 1 mei 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie [REDACTED] gevoegd. Dit advies is opgesteld op 18 april 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven  
[REDACTED]

[REDACTED]  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

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

**Datum:**  
6 juni 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD2120020171204



# Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: ATKB  
Adres: Poppenbouwing 34  
Postcode en plaats: 4191 NZ GELDERMALSEN  
Deelnemersnummer: 21200

deze projectvergunning voor het tijdvak 6 juni 2017 tot en met 1 mei 2022, voor het project "Het nemen van weefsels van vissen ten behoeve van onderzoek naar de visstand, gericht op het formuleren van beheersmaatregelen en het monitoren van de effecten hiervan." met aanvraagnummer AVD2120020171204, volgens advies van Dierexperimentencommissie [REDACTED]. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Adviseur ecologie.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 26 april 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 april 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 22 mei 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 18 april 2017, ontvangen op 26 april 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 22 mei 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1 Het nemen van weefsels van levende vissen ten behoeve van onderzoek naar de visstand, gericht op het formuleren van beheersmaatregelen en het monitoren van de effecten hiervan</b>				
	Andere vissen (andere Pisces) /	10.000	1% Matig 99% Licht	
<b>3.4.4.2 Het nemen van weefsels van dode vissen ten behoeve van onderzoek naar de visstand, gericht op het formuleren van beheersmaatregelen en het monitoren van de effecten hiervan</b>				
	Andere vissen (andere Pisces) /	25.000	Licht	



**Aanvraagnummer:**  
AVD2120020171204

**Voorwaarden**

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



**Aanvraagnummer:**

AVD2120020171204

## Weergave wet- en regelgeving

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

**Aanvraagnummer:**  
AVD2120020171204

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.

#### **Locatie**

De vergunning wordt verleend voor een project waarbij dierproeven geheel of gedeeltelijk worden verricht buiten een inrichting van een gebruiker (artikel 10g van de wet).

Inventaris Wob-verzoek W17-11										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 20171304	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x			
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x		x			
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x						
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x						
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x						
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4			x						
8	DEC-advies				x		x			
9	Ontvangstbevestiging				x		x			
10	Adviesnota CCD		x						x	
11	Beschikking en vergunning				x		x			

AVD4010020171304

04 MEI 2017

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.

## 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 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	40100														
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Stichting Wageningen Research</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>9098104</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Wageningen Research	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	9098104									
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.	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Akkermaalsbos 12</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>59</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td><del>6700 AW Wageningen</del> 6700 AB Wageningen</td></tr><tr><td>Iban</td><td>NL10RABO0397066465</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Wageningen UR</td></tr></table>	Straat en huisnummer	Akkermaalsbos 12	Postbus	59	Postcode en plaats	<del>6700 AW Wageningen</del> 6700 AB Wageningen	Iban	NL10RABO0397066465	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR					
Straat en huisnummer	Akkermaalsbos 12																
Postbus	59																
Postcode en plaats	<del>6700 AW Wageningen</del> 6700 AB Wageningen																
Iban	NL10RABO0397066465																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker	<table><tr><td>(Titel) naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Onderzoeker</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Email adres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	Onderzoeker		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		Email adres	[REDACTED]	
(Titel) naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Onderzoeker																
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	onderzoeker
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?

[ ] Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <b>Melding Machtiging</b> mee met deze aanvraag
[X] Nee

## 2 Over uw aanvraag

2.1 Wat voor aanvraag doet u?

<input checked="" 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?

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 startdatum

1-1-2018

3.2

Wat is de einddatum van het project? Wat is de titel van het project?

31-12-2022

Onderzoek aan visbestanden

3.3

Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Onderzoek aan visbestanden

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?

Nieuwe aanvraag Projectvergunning €

1684,-

4.2

Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD

Wijziging €

Via een eenmalige incasso

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

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	[REDACTED]
Functie	[REDACTED]
Plaats	Wageningen
Datum	1-5-20
Handtekening	[REDACTED]

### 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.  | Onderzoek aan visbestanden    |

## 2 Categories

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

### Onderzoek visbestanden

In dit project worden onderzoeken beschreven, waarbij gegevens worden verzameld over de opbouw, omvang en verspreiding van visbestanden. Met deze gegevens kan advies gegeven worden over de benutting van deze visbestanden, wat bijdraagt aan een goed beheer van deze visbestanden. De uitvoering van de onderzoeken komt veelal voort uit wettelijke verplichtingen, die vanuit de Europese Unie aan lidstaten worden gesteld. Deze verplichtingen zijn vastgelegd in nationale en internationale wetgeving. Een belangrijke Europese wetgeving is de Data Collection Framework (DCF). De DCF bestaat uit een aantal verordeningen en beschikkingen, die de lidstaten van de EU verplichten gegevens te verzamelen over de visserij en de visbestanden. Het gaat om biologische gegevens over de visbestanden en economische en statistische gegevens over de visserij, aquacultuur en verwerkende visindustrie. In de DCF wetgeving is vastgelegd welke gegevens er moeten worden verzameld en wanneer ze moeten worden opgeleverd. Er zijn criteria gesteld aan de kwaliteit die wordt nagestreefd. Ook wordt samenwerking tussen de lidstaten bij het verzamelen en analyseren van de gegevens door de DCF gestimuleerd. Internationale samenwerking met andere landen speelt een grote rol bij het verzamelen van gegevens over de visserij en de visbestanden maar ook bij de verwerking en analyse van de gegevens en het geven van advies op basis van de gezamenlijk verzamelde informatie. De internationale coördinatie van deze activiteiten wordt gedaan door een internationale Europese organisatie ICES (International Council for the Exploration of the Sea). Een andere wetgeving die monitoring verplicht is de Kaderrichtlijn Water, waarvoor visgemeenschappen bemonsterd moeten worden en de kwaliteit van watersysteem beoordeeld wordt onder andere aan de hand van de samenstelling van de visgemeenschap.

### Advisering

Advisering over visbestanden vloeit voort uit internationale verplichtingen met betrekking tot het bepalen van de stand van het ecosysteem, waterkwaliteit en de aanwezige visgemeenschap. Naast advisering over de toestand van de visbestanden worden tevens adviezen gegeven die betrekking hebben op een verbetering van de exploitatie van de bestanden, vermindering van ongewenste neveneffecten zoals bijvangst van de visserij, de effectiviteit van beleidsmaatregelen en bijdragen aan oplossingen van knelpunten in de visserij. De gegevens worden ook gebruikt voor ecosysteem- en voedselwebanalyses. Voor de zeevisbestanden vindt zowel de gegevensverzameling, advisering en toestandsbeoordeling plaats in

een internationaal kader. Voor niet migrerende zoetwatervisbestanden vindt dit meer op nationaal niveau plaatsvindt, terwijl voor migrerende zoetwatervissen dit plaatsvindt in samenwerking met omliggende landen. Advisering betreft zowel commercieel beviste soorten (doelsoorten van de visserij) als niet commercieel beviste soorten.

### **Gegevens voor advisering**

Gegevens die worden verzameld over de opbouw, omvang en verspreiding van visbestanden zijn afkomstig vanuit twee hoofdbronnen:

1. Vangsten door de beroepsvisserij met visserijschepen
2. Vangsten door onderzoekers met onderzoeksvaartuigen (bestandopnames of surveys)

#### **1. Gegevens beroepsvisserij**

Gegevens over visbestanden zijn onder andere afkomstig uit de beroepsvisserij. Vangsten kunnen worden ingedeeld naar commercieel verhandelde vissen en bijvangst. Bijvangst is dat deel van de vangst die niet commercieel benut kan/mag worden en weer overboord gezet wordt of juist aan boord gehouden moet worden, vaak vanuit een wettelijke verplichting. Bijvangst bestaat uit vissen van commercieel verhandelbare vissoorten die kleiner zijn de minimum aanvoermaat, vissen met weinig of geen commerciële waarde, vissen die beschermd onder bijvoorbeeld de Flora- en Faunawet en bodemdieren. In sommige visserijen kunnen de discards van een soort een substantieel deel uitmaken van de gehele vangst van deze soort en wordt dus maar een bepaald deel van de vangst van deze soort commercieel verhandeld. Om een indicatie te geven van de omvang van de vangsten door beroepsvisserij in 2015 in de Noordzee: haring 494 miljoen kg (inclusief Skagerrak en het Engels kanaal), schol 85 miljoen kg aanlandingen en 49 miljoen kg discards (Noordzee), tong 13 miljoen kg aanlandingen en 1,6 miljoen kg discards (Noordzee) en kabeljauw 39 miljoen kg aanlandingen en 14 miljoen kg discards (inclusief Skagerrak en het Engels kanaal). Bron [www.ices.dk](http://www.ices.dk).

Vissen afkomstig uit de beroepsvisserij, waarbij geen aanpassing voor wetenschappelijk onderzoek plaatsvindt aan de normale bedrijfsvoering, vallen in principe buiten de WOD, tenzij de vissen nog levend zijn op het moment dat handelingen uitgevoerd worden en deze handelingen een dermate mate van ongerief geven dat de vissen onder de WOD vallen. In dat geval vallen deze vissen wel onder de WOD.

#### **2. Gegevens jaarlijkse bestandsopnamen**

Naast gegevensverzameling van beroepsvisserijen (visserijafhankelijke data) wordt aanvullend onderzoek gedaan om gegevens te verzamelen die onafhankelijk van de beroepsvisserij zijn. Deze onderzoeken worden bestandsopnamen of surveys genoemd en deze worden hoofdzakelijk uitgevoerd op gespecialiseerde onderzoeksschepen met speciaal voor onderzoek gemaakte visnetten. Om de resultaten van deze surveys te kunnen vergelijken (tijdserie analyse) met die van voorgaande jaren is een grote mate van standaardisatie gewenst. Zo wordt door de onderzoeksvaartuigen vaak ieder jaar met hetzelfde soort visnet gevist in dezelfde periode en in het zelfde gebied. Sommige surveys zijn gericht op bodemvis (bentische of demersale vissoorten), andere op in de waterkolom zwemmende vis (pelagische vissoorten). Daarnaast kan ook bij het onderzoek naar een vissoort onderscheid gemaakt worden tussen bestandsopnamen op jonge vis en volwassen vis, omdat deze kunnen voorkomen in verschillende gebieden en/of verschillende perioden van het jaar. Tijdens deze surveys worden vissen die bijgevangen worden soms ook voor aanvullende onderzoeken ingezet, bijvoorbeeld voor merk- en terugvangst experimenten.

Surveys vinden doorgaans plaats door gebruik van een vistuig. Er bestaan verschillende type vistuigen die gebruikt worden. Vistuigen kunnen actief voortbewogen worden of worden passief op een locatie neergezet, waarbij vissen in het vistuig moeten zwemmen. Een voorbeeld van een actief gevist visnet is een boomkor; een net dat gespreid wordt door een buis in de opening van het net en dat voortgesleept wordt door een schip. Een voorbeeld van een passief vistuig is bijvoorbeeld een visfuij of staand want. In een visfuij zwemmen vissen een netwerk in via verschillende compartimenten om in het laatste compartiment verzameld te worden. In staand want moeten vissen actief het net inzwemmen, waarin de vissen vervolgens vast raken achter de kieuwen, of verstrikt in het net doordat bijvoorbeeld vinstralen blijven haken.

Naast surveys, waarbij met name onderzoek gedaan wordt aan de hand van vistuigen, worden ook andere technieken gebruikt voor het bepalen van trends in visbestanden. Zo wordt onderzoek gedaan met sonar tijdens zogenaamde akoestische surveys. Met behulp van een sonar wordt het te bemonsteren gebied afgescand. De akoestische signalen kunnen worden herkend en de hoeveelheid en intensiteit van de signalen geven een beeld van de hoeveelheid vis dat aanwezig is. Echter is het aan de hand van de sonarbeelden niet altijd mogelijk om vast te stellen om welke vissoort het gaat en wat de lengtes zijn van deze vissen. Bij deze surveys worden hierom van tijd tot tijd vistrekken gedaan met een actief gesleept net om de (soort)samenstelling van de vis die met de akoestische signalen gedetecteerd is te bepalen.

### **Toestandsbeoordeling**

Advisering over commercieel beviste visbestanden is onder andere gebaseerd op een jaarlijkse toestandsbeoordeling van deze visbestanden. Bij deze toestandsbeoordeling worden gegevens gebruikt uit zowel de beroepsvisserij als uit onderzoeksvisserijen. Bij een toestandsbeoordeling wordt de omvang van een visbestand berekend met wiskundige modellen, waarbij biologische gegevens de basale input voor deze leveren. Aan de hand van andere wiskundige modellen kan een inschatting gemaakt worden wat bij een bepaald mate van visserijinspanning kan gebeuren met het visbestand in de toekomst. Voor sommige bestanden met veel gegevens is het mogelijk om omvang van visbestanden te berekenen in biomassa, voor andere vissoorten is dit niet mogelijk en worden adviezen gegeven aan de hand van veranderingen (trends) in vangstgegevens. Om een indicatie te geven van de omvang van enkele visbestanden in de Noordzee: in 2015 was het paaibestand van volwassen vissen voor haring in de Noordzee 1,8 miljard kg (inclusief Skagerrak en het Engels kanaal), schol 755 miljoen kg (enkel Noordzee), tong 49 miljoen kg (enkel Noordzee) en kabeljauw 153 miljoen kg (inclusief Skagerrak en het Engels kanaal). Bron [www.ices.dk](http://www.ices.dk).

### **Ecosysteem- en voedselwebbeoordeling**

Gegevens van commercieel beviste en niet commercieel beviste soorten worden gebruikt voor advisering over de staat van het ecosysteem en voedselwebinteracties. Zo zijn sommige soorten beperkt of niet van belang voor de commerciële visserij, maar wel van groot belang om te dienen als voedsel voor bijvoorbeeld vogels en zeezoogdieren. Hiervoor worden veelal gegevens van onderzoeksvisserijen gebruikt, omdat vanuit de beroepsvisserij geen gegevens beschikbaar zijn. De beroepsvisserij mag niet alle vissoorten naar de markt brengen en voor de soorten die niet commercieel benut worden, zijn onderzoeksvisserijen veelal de enige vorm van informatie over de visbestanden voor deze soorten.

### **Specifieke vangsten**

Elk vistuig dat wordt ingezet, is specifiek voor de te vangen vissoorten en lengtes van de vissen. Daarbij moet ook rekening gehouden worden waar de vis zich in de waterkolom bevindt (in het midden van het water (pelagisch) of op de bodem (benthisch)). Weinig/geen bodemvissen zullen worden gevangen in een net dat aan de oppervlakte vist. Ook zullen kleine vissen niet gevangen worden in een net met grote mazen (gaan de vissen doorheen) of zullen grote vissen voor een net met kleine mazen kunnen uitzwemmen, doordat dit net niet snel gevist kan worden door de waterweerstand. Daarnaast is vis mobiel en kan het afhankelijk van de periode in verschillende gebieden leven. Dit kan enkel zoet water, enkel zout water, overgangsgebieden (estuaria), maar vissen kunnen ook gedurende verschillende levensstadia in zowel zoet als zout leven (denk aan zalm of aal). Daarnaast verspreiden sommige exemplaren of soorten zich gedurende hun levenscyclus over een klein gebied (vis in een klein afgesloten meertje), terwijl andere exemplaren of soorten zich over een groot leefgebied verplaatsen. Een voorbeeld hierbij is de Europese aal die in het Europese binnenwater leeft om vervolgens naar de Sargassozee te zwemmen (migreren) om zich daar voort te planten. Ook kunnen vissen in verschillende levensstadia verschillende gebieden benutten. Om rekening te houden met deze factoren is het vaak noodzakelijk om vangsten van verschillende gegevensbronnen als beroepsvisserij en verschillende surveys gecombineerd te gebruiken om voor een soort het meest precieze beleidsadvies te geven.

**Leeftijdsbepaling** Gegevens over de leeftijd van vissen geeft informatie over de leeftijdsopbouw van een visbestand. Veel van de toestandsbeoordelingen (wiskundige modellen) die gebruikt worden, zijn gebaseerd op leeftijd-gestructureerde gegevens, omdat deze gegevens de meest betrouwbare beoordelingen en modelvoorspellingen geven. De leeftijd van vissen kan worden afgelezen van verschillende structuren, zoals gehoorsteentjes (otolieten), schubben, vinstralen en ruggewervels. Op deze structuren worden jaarringen gevormd door verschil in afzet van materiaal door verschil in groei gedurende de verschillende seizoenen. Deze jaarringen geven de leeftijd van een vis weer (overeenkomstig met een jaarringen op een boom). Welke structuur het best gebruikt kan worden is afhankelijk van de vissoort. Voor enkele vissoorten kunnen schubben of vinstralen gebruikt worden, echter voor veel soorten geven de gehoorsteentjes in de hersenen veruit het meest precies de leeftijd weer van vissen en zijn schubben en vinstralen slecht of niet bruikbaar. Haaien en roggen maken in het geheel geen gehoorsteentjes aan, waarvan de leeftijd afgelezen kan worden.

### 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?

### Algemene doelstelling

De onderzoeken worden verricht om gegevens te verzamelen, die worden gebruikt voor beleidsadvies in het kader van visserij en het ecosysteem. Hiervoor worden gegevens van de beroepsvisserij (aanlandingen en bijvangsten) als gegevens van vissurveys samen gebruikt om te komen tot een zo precies mogelijk beeld van de omvang, opbouw en verspreiding van de visbestanden. Door het combineren van deze verschillende gegevensbronnen en deze te analyseren, worden beleidsuitvoerende overheden geïnformeerd over de toestand van de visbestanden, lange en korte termijn effecten van de exploitatie op deze bestanden en voedselweb- en ecosysteemvraagstukken.

### Haalbaarheid van het project

De onderzoeken worden jaarlijks op een gestandaardiseerde manier uitgevoerd om trends in de tijd goed te kunnen volgen en daarmee de beleidsvraagstukken te kunnen beantwoorden. De verschillende onderzoeken worden al jaren uitgevoerd door het instituut. Al het materiaal, de bemensing, de kennis en ervaring is beschikbaar om alle onderzoeken met goed gevolg uit te voeren binnen de periode die verplicht wordt gesteld vanuit de internationale en nationale wetgeving.

### 3.3 Relevance

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

### Maatschappelijk belang

De gegevens worden gebruikt om te zorgen dat de visbestanden goed worden beheerd, zodat in de toekomst de aanwezigheid van visbestanden gewaarborgd blijven. Het juist bepalen van de omvang van visbestanden resulteert vanuit een visserijperspectief enerzijds dat er geen te hoge visserijdruk op de visbestanden wordt geleverd en anderzijds dat voldoende vis gevangen kan blijven worden om als voedsel te dienen. Vanuit een ecosysteem perspectief is het van groot belang dat de leeftijdsopbouw van visbestanden en de soortenaanwezigheid (van bijvoorbeeld kleine vissoorten die kunnen dienen als voedsel voor andere dieren als andere vissen, krabben, vogels en zeezoogdieren, tot de top-predatoren) evenwichtig blijft.

### **Wetenschappelijk belang**

Met het uitvoeren van de onderzoeken wordt voldaan aan de wettelijke verplichtingen die gesteld worden aan de monitoringen. De gegevens zijn noodzakelijk om daarmee de meest precieze toestandsbeoordeling van visbestanden en vangstvoorspellingen te bepalen, of de meest precieze voedsel en ecosysteem effecten te bepalen, om daarmee betrouwbare adviezen te geven aan wetgevende overheden.

---

### **3.4 Research Strategy**

---

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

---

De onderzoeken worden jaarlijks op een gestandaardiseerde manier uitgevoerd. Door het combineren van deze verschillende gegevensbronnen (beroepsvisserij en onderzoeksvisserij) en deze te analyseren, kunnen de meest precieze adviezen gegeven die bijdragen bij aan het beheer en veilige exploitatie van visbestanden. Vissen uit het wild die vallen onder de Wet op de Dierproeven worden bij het visserijonderzoek met name benut voor het verkrijgen en onderzoeken van organen, weefsels en leeftijdsstructuren en zijn afkomstig van beroepsvisserij en onderzoeksvisserij.

Leeftijden van vissen kunnen worden bepaald aan de hand van botstructuren (otolieten, schubben, vinstralen e.d.), vissen kunnen inwendig onderzocht worden om onder andere geslacht, geslachtsrijpheid en fecunditeit (vruchtbaarheid) vast te stellen aan de hand van de geslachtsorganen, de maaginhoud of aanwezigheid van inwendige parasieten kan worden onderzocht en weefsels kunnen worden afgenomen voor verschillende doeleinden (bijvoorbeeld analyse van dna).

Bij sommige vissen als haaien en roggen kunnen geen leeftijden worden bepaald aan de hand van otolieten (die ontbreken), maar middels merken kan aanvullende informatie verkregen worden over het verspreidingsgebied van deze vissen en het effect van visserij op deze visbestanden.

---

#### 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.

---

De projectaanvraag bevat vier bijlagen en bij drie van de vier bijlagen worden vissen gedood voor onderzoek van organen, weefsels en leeftijdsstructuren.

1) De eerste bijlage beschrijft het doen van onderzoek aan boord van onderzoeksschepen in het zoute en brakke water, waarbij organen, weefsels en leeftijdsstructuren worden verzameld en biologische parameters als leeftijd, geslacht en geslachtsrijpheid onderzocht worden bij vissen die hiervoor na vangst, sortering, soortdeterminatie en lengtemetingen gedood worden. Bij surveys wordt gedurende een periode van het jaar hetzelfde gebied op dezelfde wijze bemonsterd. De surveys verschillen in de beoogde vissoort die onderzocht worden (benthisch tegenover pelagische vissoorten) en de monitoring is afgestemd op het vangen en onderzoeken van deze visbestanden.

2) Tijdens onderzoek uitgevoerd in bijlage 1) worden haaien en roggen gevangen. Deze worden voorzien van een merkteken voor onderzoek naar de omvang van de populaties en de verspreiding van deze soorten. De vissen worden vervolgens weer levend teruggezet. Bij deze haaien- en roggensorten kunnen geen otolieten verkregen worden voor leeftijdsanalyse en kan geslacht vaak visueel extern vastgesteld worden, waardoor de noodzaak niet aanwezig is om deze vissoorten te doden voor het desbetreffende doel.

3) In sommige visserijen worden van enkele soorten procentueel veel bijvangst gevangen en deze aantallen zijn van invloed op het precies

inschatten van de omvang van de visbestanden. Uit de bijvangst gevangen door beroepsvissers worden door zowel opstappers van het instituut, als door beroepsvissers zelf, van enkele specifieke soorten vissen geselecteerd, waarvan op een later moment leeftijdsstructuren, organen en weefsels onderzocht worden. Het nemen van deze vismonsters vindt het gehele jaar rond plaats en deze gegevens geven aanvullende informatie over de staat van de visbestanden naast gegevens van vangsten van marktwaardige vissen door de beroepsvisserij en gegevens van de surveys, welke maar gedurende een bepaalde periode van het jaar uitgevoerd worden.

4) Tijdens surveys en bij beroepsvissers in het binnenwater (IJsselmeergebied en andere gebieden in Nederland) worden van gevangen vissen de organen, weefsels en leeftijdsstructuren onderzocht. Handelingen bij vissen uit de reguliere vangst afkomstig van een beroepsvisser, welke gedood worden voor verkoop door de beroepsvisser heeft een uitzondering op de Wet op de Dierproeven. Echter zijn in deze bijlage de commercieel gevangen vissen nog levend ten tijde van aanvang het onderzoek en worden hierom in de aanvraag meegenomen.

---

#### 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

---

De onderzoeken die verricht worden, komen voort uit de wettelijke verplichtingen en worden jaarlijks routinematig uitgevoerd met dezelfde wijze. Drie van de vier bijlagen beschrijven de handelingen van het vangen van de vissen, vangstverwerking, lengtemetingen nemen en het onderzoeken van organen, weefsels en leeftijdsstructuren. Daarbij wordt onderscheid gemaakt tussen surveys in het zoute water, bijvangst monitoring bij beroepsvissers in het zoute water en onderzoek in het binnenwater. Sommige vissoorten leven enkel in het zoute water, andere enkel in het zoete water. Echter kunnen ook voor vissen die leven in zowel zoet als zout water en/of brak getijdengebied gegevens van verschillende monitoringen uit zoet en zout water gecombineerd worden om goede adviezen over deze soorten te kunnen geven.

Omdat haaien en roggen die gevangen worden tijdens surveys in het zoute water geen otolieten hebben, het geslacht visueel kan worden vastgesteld en de soorten pas op late leeftijd geslachtsrijp worden, worden deze soorten voorzien van een merkteken om via terugvangst te komen tot informatie over de bestanden.

De onderzoeken beschreven in de bijlagen worden onafhankelijk van elkaar en soms ook parallel in de tijd naast elkaar uitgevoerd. De beroepsvisserij vist vaak met andere vistuigen, in andere gebieden en/of andere perioden en dat levert vervolgens informatie op over een ander segment van het visbestand dan de vangsten uit de surveys. Ook worden surveys in verschillende gebieden met andere tuigen uitgevoerd en elk vistuig is specifiek voor de te vangen vissoorten en deel van het bestand dat gevangen wordt, zoals al beschreven in de achtergrond (3.1). Door juist alle gegevensbronnen te combineren, dus zowel vangsten (aanlandingen en discards) van de beroepsvisserij (inclusief gegevens van aanlandingen uit de beroepsvisserij, welk niet onder de Wet op de Dierproeven vallen) als van verschillende surveys, wordt informatie verzameld over de opbouw, omvang en verspreiding van de visbestanden, om daarmee de meest precieze jaarlijkse adviezen over onderzochte commercieel of niet commercieel benutte visbestanden te kunnen geven. Het wegvallen van één van deze gegevensbronnen resulteert voor veel belangrijke commercieel benutte vissoorten dat niet van het (gehele) bestand voldoende informatie aanwezig is, waardoor een minder en beperkt betrouwbaar en/of precies advies gegeven kan worden aan uitvoerende overheden. Tevens moeten de onderzoeken uitgevoerd worden om te voldoen aan de wettelijke verplichten tot jaarlijkse gegevensverzameling aan visbestanden.

---

#### 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	Onderzoek weefsels en organen surveys zout
2	Merken haaien en roggen tijdens surveys zout
3	Onderzoek weefsels en organen bijvangst
4	Onderzoek weefsels en organen vis binnenwater

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.	WR				
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="622 880 1341 904">Serial number</th> <th data-bbox="1352 880 2069 904">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="622 912 1341 936">1</td> <td data-bbox="1352 912 2069 936">Onderzoek weefsels en organen surveys zout</td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Onderzoek weefsels en organen surveys zout
Serial number	Type of animal procedure					
1	Onderzoek weefsels en organen surveys zout					

## 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.

---

Een survey (onderzoeksvisserij) is een gestandaardiseerde monitoring, waarbij jaarlijks wordt gevist gedurende dezelfde periode van het jaar, met hetzelfde vistuig, op jaarlijks dezelfde locaties met een gelijke aantal vistrekken van gelijke tijdsduur. Een selectie van vissen uit de vangst worden na vangstverwerking gedood voor het onderzoeken van leeftijdsstructuren, organen en weefsels. De gegevens van deze surveys geven aanvullende informatie op vangsten uit de beroepsvisserij en informatie over soorten en lengtes van vissen die niet in de beroepsvisserij gevangen worden. Doordat surveys een groot gebied bestrijken en bijvoorbeeld niet alleen vissen op goede visstekken waar de beroepsvisserij vist maar ook in andere locaties, geven surveys goede informatie over de opbouw en verspreiding van de visbestanden. Gegevens van surveys worden onder andere gebruikt voor toestandsbeoordelingen, ecosysteem- en voedselwebstudies.

Tijdens een survey wordt veelal wordt met een visnet gevist om de vissen te vangen en worden alle vissen in het net gemeten en geteld. Voor sommige vissoorten (makreel en horsmakreel) worden echter ook ei-surveys (vangen van visseneieren) gebruikt voor bestandsschattingen. Om een bepaling te maken van het aantal eieren in zee wordt gevist met een planktontorpedo, waarin de eieren worden opgevangen (deze handeling valt niet onder de wet op de dierproeven). Met een groot visnet in de waterkolom wordt aanvullend gelijktijdig gevist op volwassen vissen voor het onderzoeken van leeftijdsstructuren, organen en weefsels, om onder andere de ontwikkelingsstadium van de geslachtsorganen te bepalen.

Ook andere technieken dan het vissen met een visnet kunnen soms gebruikt worden voor het bepalen van trends in het visbestand. Zo wordt ook onderzoek gedaan tijdens zogenaamde akoestische surveys, waarbij met behulp van een sonar het te bemonsteren visgebied gescand wordt naar scholen vis in de waterkolom. Aan de hand van de hoeveelheid en intensiteit van de akoestische signalen wordt bepaald hoeveel vis aanwezig is in de waterkolom. Echter is het aan de hand met deze techniek nog niet in alle gevallen mogelijk om vast te stellen om welke vissoort het gaat en wat de lengteverdeling is van deze vissen in het signaal dat gezien wordt. Daarom worden tijdens deze surveys ook enkele vistrekken gedaan met een actief gesleept net om de akoestische signalen te ijken en te valideren.

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

---

Surveys worden veelal uitgevoerd met visnetten. Per survey verschilt het type vangtuig, type net en maaswijdte en de vangstduur om zo specifiek mogelijk op de beoogde vissoorten te vissen. De vervolghandelingen aan de vissen na vangst zijn vervolgens veelal hetzelfde. Bij surveys op het zoute water worden vissen gevangen met een gesleept net, waarbij trekduur varieert tussen 10 en 30 minuten. De duur van een vistrek waarbij volwassen vissen gevangen worden tijdens de ei-survey is tot maximaal 2 uur. In de Noordzee is het soms mogelijk om tijdens de ei-survey makreel met de hengel te vangen (deze methode werkt niet op de Atlantische Oceaan en niet voor horsmakreel). Als makreel met de hengel gevangen kan

worden wordt de tijd tussen vangst en bepalen van lengtes en nemen van otolieten en kuit- en weefselmonsters aanzienlijk verkort tot 10 minuten. In de Noordzee wordt op een station daarom eerst geprobeerd om met de hengel makreel te vangen, lukt dat niet dan wordt het grote net gebruikt voor de vangst.

Tijdens de akoestische surveys worden transecten (rechte lijnen) gevaren in het gebied waar met behulp van akoestische sonar de totale hoeveelheid vis geschat wordt. Om de akoestische signalen te ijken is het noodzakelijk om vissen uit de visscholen die gedetecteerd worden te vangen. Daarom wordt gevist met een pelagische trawl om de soortsaamenstelling, lengteverdeling en leeftijdsopbouw van de visscholen te bepalen. Met de netten waarmee gevist wordt, worden door het open water gesleept en worden er vistrekken van ca. 2-4 uur uitgevoerd. De opening van de netten kan hierbij verschillen, maar varieert van een tiental tot enkele tientallen meters lang en breed.

Na vangst in het vistuig komt de vangst aan boord voor determinatie en lengtemetingen. Bij kleinere vangsten kan direct begonnen worden met soortdeterminatie en lengtemetingen. Bij grote vangsten worden eerst alle vissen per soort gesorteerd. Dit is afhankelijk van de capaciteit aan boord, soortsaamenstelling van de vangst en aanwezigheid van ander materiaal, hier kan geen specifieke omvang van de vangst voor gegeven worden als richtlijn. De hele vangst of een bepaald deel van de vangst van een desbetreffende soort (subsample) bij grote vangst wordt daarna gemeten op lengte door de vissen te leggen op een meetplank en de lengte af te lezen. Daarbij moet bij een visnetsurvey, om de proefdieren die gebruikt worden te selecteren, eerst de gehele vangst worden gedetermineerd, gesorteerd op soort en gemeten op lengte om de juiste aantallen proefdieren per centimeter per soort te krijgen. Vissen die niet verder onderzocht worden, worden weer teruggezet in het vangstwater na lengtemetingen. Na de selectie worden de proefdieren zo snel mogelijk gedood door een snede door de hersenen. Afhankelijk van de vangst duurt het enkele minuten tot een half uur voor de vangst gesorteerd en de lengtes van de vissen gemeten zijn.

Van vissoorten die van belang zijn voor de commerciële visserij worden per gebied het aantal van tevoren internationaal afgesproken aantal vissen gedood voor het verkrijgen van leeftijdsstructuren, organen en weefsels. Daarnaast worden ook van andere vissoorten van belang voor ecosysteem studies vissen gedood voor het onderzoeken van leeftijdsstructuren, organen en weefsels. Van tevoren niet kan worden bepaald hoeveel vissen per trek gevangen worden en van welke soorten en kan niet voordat een survey uitgevoerd is vastgesteld worden hoeveel vissen werkelijk gebruikt gaan worden; dit kan enkel pas na uitvoer van de survey.

Na de selectie worden de proefdieren zo snel mogelijk gedood door een snede door de hersenen of hersenstam en het openbreken van de kop. Van de vissen worden vervolgens de otolieten verzameld voor leeftijdsanalyse op een later moment en de vissen worden inwendig onderzocht om bijvoorbeeld geslacht en geslachtsrijpheid vast te stellen aan de hand van de geslachtsorganen. Daarnaast kunnen de vissen verder worden onderzocht op maaginhoud of kunnen weefsels verzameld worden voor verdere doeleinden, zoals analyse van DNA of het verzamelen van otolieten van zeldzame vissen voor bijvoorbeeld referentiemateriaal voor dieetstudies bij vogels.

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

---

Het aantal vissen dat geselecteerd worden voor het verkrijgen van organen en weefsels wordt volgens internationale richtlijnen afgestemd tussen de verschillende lidstaten. Bij de surveys wordt per lengteklasse groep (bijvoorbeeld de groep vissen die een lengte heeft tussen 5-10 cm) een aantal

vissen onderzocht. Het aantal vissen dat per lengteklasse groep wordt onderzocht is onder andere afhankelijk van de vissoort (groeisnelheid, minimale lengte in de vangst en maximale lengte), vangstlocatie (leeftijdsopbouw van de soort het beviste gebied) en het gebruikte vistuig (vistuigen zijn selectief, zie inleiding bij projectaanvraag). Het aantal te onderzoeken vissen is bepaald zodat de aantallen voldoende informatie geven over de leeftijdsopbouw van een soort, rekening houdend met de variatie in plaats en tijd. Zo worden voor vissoorten met een kleinere lengterange per centimeterklasse meer vissen onderzocht dan bij vissoorten met een grote lengterange.

Bij het vaststellen van het aantal vissen dat onderzocht wordt bestaan grote verschillen tussen het theoretische maximale aantal dat benut kan worden volgens het te hanteren protocol en het aantal vissen dat jaarlijks daadwerkelijk onderzocht wordt aan boord tijdens de surveys. Het theoretische potentieel te vangen aantal vissen wordt berekend op basis van de gehele vangbare lengterange van een vissoort. Dit wil zeggen: de lengte van het moment dat deze te groot zijn geworden om door de mazen van het net te ontsnappen en in het net achterblijven tot de maximale lengte dat een vissoort kan halen.

In de praktijk wordt het theoretisch aantal proefdieren niet gehaald. Zo komen grote vissen veel minder in de vangsten voor en kunnen lengteklassen of zelfs soorten ontbreken in het beviste gebied. De theoretische aantallen zouden zo veel hoger uitkomen dan de werkelijke aantallen, dat dit onrealistische aantallen zou geven. In deze aanvraag wordt om deze redenen voor de aantallen per vissoort per survey uitgegaan van de hoogste aantal vissen per soort onderzocht per jaar, berekend over de afgelopen 10 jaar.

Per surveys worden vissen per geselecteerd gebied onderzocht. Op zee zijn dit van tevoren internationaal afgestemde gebieden, waar binnen een aantal vissen per centimeter groep van een soort onderzocht moet worden. De gebieden zijn historisch bepaald om een representatief lengte-leeftijd verdeling te hebben van de populatie in dit gebied.

Bij ei-surveys worden per reis vistrekken uitgevoerd en per trek worden (maximaal) 100 makreel en/of horsmakreel in de Atlantische oceaan en 100 makreel in de Noordzee onderzocht. Voor makreel wordt de jaarlijkse eiproductiemethode AEPM gebruikt. Makreel fecunditeit en atresia variëren over de paaiperiode en paaigebied, waardoor makreel tijdens alle drie de reizen onderzocht wordt. Voor horsmakreel wordt de dagelijkse eiproductiemethode DEPM gebruikt, omdat deze vis paait in een paaipeik. Hierdoor is enkel bemonstering tijdens de paaipeik noodzakelijk en kan volstaan worden met bemonstering tijdens 1 reis. Tijdens de overige Atlantische Oceaan reizen worden per reis (twee reizen tijdens 5 jaar) 10 horsmakrelen aanvullend verzameld voor biologische parameters om te kijken wat de staat van de geslachtsorganen is en of de genetische verspreiding van horsmakreel in het begin van het paaiseizoen anders is dan tijdens de paaipeik. Er wordt geen horsmakreel in de Noordzee verzameld.

---

## **B. The animals**

---

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

---

De aanvraag omvat tenminste, maar niet uitsluitend, de volgende vissoorten van verschillende afmetingen en levensstadia uit wildvang:

Blauwe wijting (*Micromesistius poutassou*), Bot (*Platichthys flesus*), dikrugtong (*Microchirus variegatus*), dwergbot (*Zeugopterus norvegicus*),

dwergtong (*Buglossidium luteum*), griet (*Scophthalmus rhombus*), grondelsoorten (*Pomatoschistus* spp), haring (*Clupea harengus*), heek (*Merluccius merluccius*), horsmakreel (*Trachurus trachurus*), kabeljauw (*Gadus morhua*), kever (*Trisopterus esmarkii*), lange schar (*Hippoglossoides platessoides*), leng (*Molva molva*), makreel (*Scomber scombrus*), schar (*Limanda limanda*), scharretong (*Lepidorhombus whiffiagonis*), schelvis (*Melanogrammus aeglefinus*), schol (*Pleuronectes platessa*), schurftvis (*Arnoglossus laterna*), sprot (*Sprattus sprattus*), tarbot (*Scophthalmus maximus*), tong (*Solea solea*), tongschar (*Microstomus kitt*), wijting (*Merlangius merlangus*), zandspieringsoorten (*Ammodytes* spp.), zeebaars (*Dicentrarchus labrax*).

De keuze voor de soorten die onderzocht worden is afhankelijk van belangrijkheid voor de visserijadvisering. Naast de veel voorkomende vissoorten die jaarlijks gevangen worden, kan ook van minder voorkomende soorten, indien deze gevangen worden en van interesse zijn voor onderzoek, materialen verzameld. Tevens worden ook aanvullend van sommige vissoorten weefsels verzameld voor voedselweb- of ecosysteemadvisering. De werkelijk gevangen aantallen vissen per soort en ook de aanvullende vissoorten zullen van jaar tot jaar verschillen en in het geval van een jaar met een uitzonderlijk grote jaarklasse van een soort of meerdere soorten kan het voorkomen dat de werkelijke aantallen vissen hoger uitkomt dan het hier aangegeven aantal. Pas na de uitvoer van de onderzoeken is het werkelijke aantal bekend en kan dit worden gerapporteerd.

Het aantal vissen per jaar is berekend over de maximale vangsten van een soort per survey per jaar op basis van eerder onderzoek over laatste tien jaar, om te voorzien dat tijdens het veldwerk uiteindelijk niet boven het totale aantal aangegeven dieren uitgekomen wordt.

Surveys zout/brak water: maximaal 18.000 per jaar, per 5 jaar 90.000

Ei-surveys: 9.020 vissen per 5 jaar

Akoestische surveys: maximaal 3.000 per jaar, per 5 jaar 15.000

Totaal aantal vissen:  $90.000+9.020+15.000 = 114.020$

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
---------	--------	---------------------------	------------

### 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: Gegevens van vangsten van beroepsvissers worden ook verzameld op visafslagen en gebruikt voor het bepalen van de omvang, opbouw en verspreiding van commercieel beviste visbestanden. Echter werken veranderingen en verbeteringen in de visserij door op de vangstgegevens van beroepsvissers en kunnen gegevens van niet commerciële vissoorten of van vissen onder de minimum maat niet van de gegevens van visafslagen verkregen worden. Veranderingen in vangstgegevens kunnen worden veroorzaakt door veranderingen in de visstand maar ook door verbeteringen in visserijtechniek. Visserijonderzoeken (surveys) worden gebruikt om gegevens van commercieel en niet commercieel beviste vissoorten te verzamelen, onafhankelijk van de inspanning die de visserij gebruikt voor het vangen van de vissen. Daarnaast worden van surveys gegevens van niet commercieel beviste vissoorten verkregen worden. Door met hetzelfde schip en zelfde vistuig jaarlijks dezelfde locaties te bevissen, wat in surveys gebeurt, zijn de gegevens niet beïnvloed door veranderingen in visserijtechniek. Hydro-acoustic surveys (vissen tellen met een echosounder) is een alternatief om de omvang van een visbestand te bepalen. Door transecten te varen in het gebied wordt met behulp van akoestische echo-apparatuur de totale hoeveelheid vissen bepaald. Dit werkt echter mate name voor vissen die in het open water zwemmen en niet voor vissen die leven in of op de bodem. Daarnaast moet worden gevist met een visnet tijdens deze survey om de soortsaamenstelling, lengteverdeling en leeftijdsstructuur van de visscholen in het sonarbeeld te bepalen. Vermindering: Het aantal te onderzoeken vissen is internationaal vastgesteld en waarborgt dat per gebied voldoende vissen onderzocht worden om voldoende informatie op te leveren over de biologie en de leeftijdsopbouw van soorten. Jaarlijks moet aan de EU gerapporteerd worden of aan het verzamelen van deze aantallen voldaan is. Daarbij moet rekening gehouden worden dat minder vissen uiteindelijk gebruikt zullen worden dan als dit opgesteld staat in het internationaal overeengekomen bemonsterprotocol. Doordat niet voor alle lengteklassen voldoende vissen in de vangst zullen zitten, zoals in het vastgestelde protocol van tevoren is opgesteld, zullen in de praktijk minder vissen onderzocht worden dan in het snijprotocol internationaal is vastgesteld. Verfijning: Tussen het moment van vangst en het moment van doding zit enige tijd, doordat alle vissen in de vangst eerst vanuit het net aan boord gehaald worden, daarna eerst gedetermineerd op soort moeten worden en daarna op lengte gemeten. De vissen die geselecteerd worden voor het verkrijgen van biologisch materiaal en otolieten worden pas na dit proces geselecteerd, omdat een select aantal vissen per lengteklasse gebruikt wordt. De overige vissen die niet geselecteerd zijn worden, worden weer overboord gezet. Omdat eerst determinatie en lengtemetingen moeten gebeuren is het niet mogelijk om vissen direct na de vangst te doden om de periode aan boord voor doding te verkorten. Tijdens eerdere ei-surveys surveys op de Atlantische oceaan is geprobeerd om makreel en horsmakreel te vangen met een hengel omdat vissen dan niet in het net zitten en er gericht naar het benodigde aantal proefdieren kan worden gevist. Maar het is niet mogelijk gebleken om makreel en horsmakreel op de Atlantische oceaan met de hengel te vangen. Op de Noordzee lukt het soms wel om makreel met de hengel te vangen. Op de Noordzee wordt daarom eerst geprobeerd te hengelen en als dat niet lukt wordt het grote net gebruikt. Gegevens van leeftijden van vissen kunnen worden afgelezen van verschillende structuren als otolieten, vinstralen, schubben etc. Afhankelijk van de soort en de eenvoud om structuren af te lezen worden voor verschillende vissoorten verschillende structuren gebruikt. Bij sommige vissoorten is het mogelijk, indien alleen de leeftijd bepaald moet worden, schubben af te nemen voor een precieze leeftijdsbepaling. Echter, voor veel vissoorten vormen otolieten de geschikte structuren om precieze leeftijdsbepaling te doen en geven andere structuren bij veel soorten geen precieze leeftijdsbepaling. De otolieten zitten in de hersenen en kunnen enkel bemachtigd worden door de vis te doden. Indien mogelijk worden vissen natgehouden. Echter is dit wel afhankelijk van de omvang van de vangst en de mogelijkheden hiertoe aan boord.

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

---

Vissen worden zo snel mogelijk na selectie gedood. Binnen de mogelijkheden aan boord van het grote onderzoeksschip wordt het sorteren en verwerken van de vissen gedaan middels opvoerbanden om het proces aan boord zo snel mogelijk uit te voeren. Aan boord van kleinere schepen en kleine boten is dit wegens de beperkte capaciteit aan boord niet mogelijk. Verdoving met verdovingsmiddel wordt niet toegepast. Het op deze grote schaal gebruiken van verdovingsmiddelen geeft problemen met afvoer van het middel en kans op nadelige milieueffecten (lekken naar het omringende water bij bijvoorbeeld ruige zee).

## 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.

---

Het betreft routinematig onderzoek. Jaarlijks wordt het onderzoek herhaald en wordt op dezelfde wijze gemonitord in hetzelfde gebied met hetzelfde vistuig om trends en veranderingen in het bestand te kunnen vaststellen. Internationaal wordt afgestemd tussen de lidstaten verantwoordelijk voor de uitvoering van deze surveys, zodat lidstaten verschillende en aansluitende gebieden bemonsteren.

## 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.

---

De dieren worden niet gehuisvest en verzorgd volgens de Richtlijn, omdat de dieren gevangen worden en zich een bepaalde tijd in een vistuig bevinden alvorens na vangst gedood worden aan boord van een schip.



## **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.

---

Aan boord van onderzoeksschepen.

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

---

Omdat de visserij niet anders uitgevoerd kan worden dan met de desbetreffende schepen en vistuigen. Bij grotere schepen wordt de visserij uitgevoerd door de bemanning van het schip. De verwerking van de vangst wordt uitgevoerd door bevoegde medewerkers.

## **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.

---

Tijdens de vangst kan pijn worden ervaren door fysieke aanraking met objecten als stenen en schelpen en bij het omhoog halen van de vangst kunnen vissen gedrukt worden tegen de netwand of andere vissen of objecten onder het gewicht van de vangst. Hierbij is het niet mogelijk om pijnverlichtingsmethoden toe te passen.

Na vangst, sorteren, determineren per soort en lengtemetingen worden de vissen geselecteerd voor het verkrijgen van monsters voor biologische gegevens en gedood middels een snede door de hersenen/hersenstam, het openbreken van de kop en het verwijderen van de otolieten. De aanwezigheid van een verdovingsmiddel in grote volumes en de onvoorspelbare weertoestand op zee verhinderen een veilig gebruik van verdovingsmiddelen.

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?

---

Vissen liggen tussen vangst en doding buiten het water, waarbij de ademhaling beperkt wordt en uitdroging van de huid plaatsvindt.

Explain why these effects may emerge.

---

Doordat vissen eerst gesorteerd, gedetermineerd en gemeten moeten worden, kan er enige tijd zitten tussen vangst en doding.

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

---

De trekduur wordt zo kort mogelijk gehouden rekening houdend dat vissen wel gevangen moeten worden en de vangsten worden zo snel mogelijk gesorteerd en verwerkt binnen de mogelijkheden die er aan boord zijn. De vissen zo snel mogelijk na selectie gedood.

### **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.

---

Indicate the likely incidence.

---

### **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 ).

---

---

Matig, gezien de vangstmethode die gebruikt worden welke speciaal voor onderzoek zijn ingezet en de tijd tussen vangst en doding. Omdat het vangen speciaal voor onderzoek gedaan wordt, is de vangstmethode meegenomen in de beoordeling van het ongerief.

## 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.

---

Van de vissen worden leeftijdsstructuren, organen en weefsels genomen, welke zonder doding niet verkregen kunnen worden.

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.

---

De vissen worden gedood door het insnijden van de hersenen of hersenstam, gevolgd door het direct openbreken van de kop. De snede is afhankelijk van de vissoort en wordt afgestemd op de ligging van de otolieten (platvis verschilt daarin van bijvoorbeeld andere vissoorten en de ligging van de otolieten is bekend voor de verschillende vissoorten). Met deze methode wordt de vis snel gedood en kunnen de gehoorsteentjes gelijk verwijderd worden. De twee volgens bijlage IV gestelde dodingsmethoden achten wij niet geschikt tijdens surveys. Het effect van het inslaan van de hersenen is soortafhankelijk en binnen een soort ook lengteafhankelijk. De kracht om een kleine vis met dunnere schedel te doden verschilt van een grote vis met dikke schedel. Daarbij is het inslaan bij lang niet alle vissoorten geschikt in verband met de harde schedel van sommige soorten. Daarnaast geeft deze methode een grote kans op beschadiging, breken of vernietiging van de gehoorsteentjes. Het gebruik van verdovingsmiddel aan boord van slingerende schepen geeft op deze schaal een probleem met het veilig gebruik, de opslag en de afvoer van het verdovingsmiddel aan boord van schepen. Enkel kleine aal die op een later moment in het lab onderzocht gaat worden, wordt gedood in verdovingsmiddel, aangezien de vissen levend niet goed gehanteerd kunnen worden om een andere dodingsmethode voor te gebruiken, zoals het insnijden van de kop.

Yes

---

Appendix  
Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website [www.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.	WR				
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="622 880 1341 904">Serial number</th> <th data-bbox="1352 880 2072 904">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="622 912 1341 936">2</td> <td data-bbox="1352 912 2072 936">Merken haaien en roggens tijdens surveys zout</td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Merken haaien en roggens tijdens surveys zout
Serial number	Type of animal procedure					
2	Merken haaien en roggens tijdens surveys zout					

## 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.

---

Veel haaien- en roggensorten worden in hun voortbestaan bedreigd en de aantallen zijn voor veel soorten drastisch teruggelopen. Om in te schatten wat de verspreiding en omvang van het bestand is en om maatregelen te kunnen treffen voor bescherming en herstel van populaties haaien en roggen, is kennis nodig over hun biologie, verspreidingspatronen en overleving. Deze kennis is voor de meeste soorten zeer beperkt. Het vaststellen van de leeftijdssamenstelling van bestanden van haaien en roggen is veelal niet mogelijk of erg lastig. Haaien en roggen hebben geen gehoorsteentjes waarvan leeftijd afgelezen kan worden, zoals vissen dat wel hebben. Haaien en roggen kunnen een groot verspreidingsgebied hebben. Om meer informatie over het haaien- en roggengbestand te krijgen worden haaien en roggen tijdens twee surveys op de Noordzee voorzien van een vismerk. Terugvangst en melding van de vangst vindt plaats door de beroepsvisserij of hengelsport.

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

---

De haaien en roggen worden na vangst en sortering geplaatst in een overlevingstank. Na het meten van de lengte van de vissen op cm voor vangstregistratie van de gehele vangst worden de vissen geselecteerd voor het merken. Het merk wordt met een tang in de rugvin (haai) of vleugel (rog) bevestigd. Elke gemerkte vis wordt nogmaals gemeten op de mm en gewogen voordat de vissen worden teruggezet in het water. Tevens wordt het geslacht bepaald op basis van uitwendige kenmerken, wat bij haaien en roggen mogelijk is. Het terugzetten van de vis wordt gedaan door de vissen in een mand, welke vast zit aan een touw, langzaam over boord te zetten in het water. Met deze merkmethode zijn goede resultaten behaald voor haaien en roggen in andere landen en ook in eerdere studies.

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

---

Er is weinig tot niets bekend over populatiegrootte en verspreidingspatronen van individuen van deze soorten in de Nederlandse wateren. Bij merkterugvangst experimenten geldt in dergelijke gevallen dat een zo groot mogelijke aantal gemerkte individuen een zo groot mogelijke kans geeft op terugvangst en daarmee data over verspreidingspatronen en overleving. Uit eerder onderzoek met haaien en roggen gemerkt in Zeeuwse wateren komt naar voren dat het terugvangstpercentage tussen de 1-3 % lag. Daarnaast tekent zich een grote verspreiding af, waarbij de dieren zich verplaatsen tot aan de kusten van Schotland en de Golf van Biskaje aan toe. Dit betekent dat over meerdere jaren en met veel gemerkte haaien en roggen gewerkt moet worden om voldoende aantallen terugmeldingen te krijgen om verspreidingspatronen en populatiegrootte in te kunnen schatten.

## B. The animals

---

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

---

Tenminste, maar niet uitsluitend, worden de volgende soorten voorzien van een merkteken: stekelrog (*Raja clavata*), gevlekte rog (*Raja montagui*), hondshaai (*Scyliorhinus canicula*), gevlekte gladde haai (*Mustelus asterias*). Indien exemplaren van een andere soort rog of haai gevangen wordt die voor onderzoek ook van interesse is, zal deze ook voorzien worden van een merk. Van tevoren kan niet worden voorspeld hoeveel haaien en roggen gemerkt zullen worden, dit is afhankelijk van het aantal exemplaren in de vangst en de mogelijkheid om de dieren te kunnen merken tijdens het uitzoeken en meten van de gehele vangst.

Gemiddeld lag het aantal haaien en roggen dat gemerkt werd de afgelopen jaren tot maximaal 200 exemplaren per jaar. Het totale aantal komt uit op maximaal  $200 \times 5 \text{ jaar} = 1000$  exemplaren.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
---------	--------	---------------------------	------------

## 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: Het is niet mogelijk om anders dan met in het wild levende haaien en roggen onderzoek te doen aan hun verspreidingspatronen en overleving. Vermindering: Het doel is juist om zoveel mogelijk vissen tijdens de survey te voorzien van een merkteken om de kans op terugvangst te vergroten. Omdat elke gevangen haai of rog die wordt gemerkt zo zorgvuldig mogelijk wordt behandeld, het plaatsen van het merk nauwelijks ongerief en geen invloed heeft op de overleving en niet speciaal extra op haaien of roggen wordt gevist voor het experiment, is in feite de populatie haaien en roggen erbij gebaat dat een zo groot mogelijk deel van de gevangen haaien en roggen wordt behandeld op de meest zorgvuldige wijze zoals met de merkprocedure wordt gedaan. Verfijning: De ingreep wordt gedaan met een uniek merkteken waarmee goede resultaten behaald zijn in eerdere proeven en experimenten voor haaien en roggen. Gebruik wordt gemaakt van een zo klein mogelijke merk met zo min mogelijk ongerief voor de vissen. Het merken van haaien en roggen aan boord wordt enkel gedaan indien voldoende tijd aanwezig is om de gevangen haaien en roggen zo diervriendelijk mogelijk van een merk te voorzien.

---

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

---

Vissen worden zo snel mogelijk uit de vangst gehaald, gemerkt en teruggezet in het water.

## 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.

---

Het doel is juist een groot deel van de haaien en roggen te voorzien van een merkteken tijdens de survey om een breed beeld te krijgen van de verspreiding en ruimte gebruik. Merken wordt ook gedaan in een ander gebied in Nederland langs de kust voor enkele soorten, waarbij beide programma's aanvullend aan elkaar zijn. Beide programma's richten zich op andere delen van de populaties.

## 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

---

## **F. Accommodation and care**

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

De vissen worden kortstondig in een overlevingsbak met water gehouden tussen vangst en merken. Na het merken worden de vissen teruggeplaatst in deze bak voordat de vissen worden teruggezet.

## **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.

Aan boord van onderzoeksschepen.

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

Omdat de visserij niet anders uitgevoerd kan worden dan met de desbetreffende schepen. De visserij wordt uitgevoerd door de bemanning van het schip, de verwerking van de vangst en het merken van de vissen door bevoegde medewerkers.

# **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.

De ingreep is kortstondig en het doel is om zo snel mogelijk de vissen en ook zo levendig mogelijk terug te zetten. Postoperatieve pijnbestrijding wordt niet toegepast, dit zoals aangeraden door Stevens (2008).



Stevens, E.D. 2008. "Pain" and analgesia in fish: What we know, what we do not know, and what we need to know, before using analgesics in fish. Fish Welfare 115-123.

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?

Vissen liggen tussen vangst en selectie en ook tijdens het merken buiten het water, waarbij de ademhaling beperkt wordt en uitdroging van de huid plaatsvindt.

Explain why these effects may emerge.

Doordat vissen na vangst eerst gesorteerd, gedetermineerd en gemeten moeten worden, kan er enige tijd zitten tussen vangst en merken.

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

De vissen worden zo snel mogelijk in water gezet en de tijdsduur van het merken wordt zo veel mogelijk beperkt.

### **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.

Indicate the likely incidence.

### **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 ).

---

Matig. De vissen worden aan een vangtuig blootgesteld en daarnaast worden de vissen na vangst voorzien van een merkteken.

## 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.

---

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

---

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

---

Yes

---

Appendix  
Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website [www.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.	WR				
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 1341 903">Serial number</th> <th data-bbox="1352 879 2069 903">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="622 911 1341 935">3</td> <td data-bbox="1352 911 2069 935">Onderzoek weefsels en organen bijvangst</td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	3	Onderzoek weefsels en organen bijvangst
Serial number	Type of animal procedure					
3	Onderzoek weefsels en organen bijvangst					

## 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.

---

Bijvangst (discards) is het deel van de vangst die niet aan boord gehouden wordt maar weer overboord gezet wordt. Er zijn verschillende oorzaken van deze praktijk maar vaak is dit een wettelijke verplichting. Discards bestaan voornamelijk uit commerciële vissen die kleiner zijn dan de voorgeschreven minimum aanvoermaten, vissen met weinig of geen commerciële waarde, vissen beschermd onder bijvoorbeeld de Flora- en Faunawet, en bodemdieren. In sommige visserijen kunnen de discards van een soort een substantieel deel uitmaken van de gehele vangst van deze soort en wordt dus maar een bepaald deel van de vangst van deze soort commercieel verhandeld. Voor het maken van precieze schattingen van het visbestand is het belangrijk rekening te houden met deze discards van deze vissoorten. De informatie over discards wordt ook gebruikt in ecologische- en voedselwebstudies.

Recent onderzoek heeft aangetoond dat een deel van deze discards het vangst- en verwerkingsproces aan boord van de Nederlandse pulsvisserij (veelgebruikte Nederlandse visserij op de Noordzee) niet overleeft. In de Nederlandse pulsvloot (visserij met een bodemnet waarbij vis met stroom de bodem uitgejaagd wordt) werden schol, tong en schar verzameld. Bij het aan boord komen leven de meeste vissen nog (80%-90% afhankelijk van soort), maar sterfte door het vangst en sorteerproces neemt vooral plaats in de eerste dagen na de vangst. Van schol, tong en schar overleeft respectievelijk 15%, 29%, en 16% (van der Reijden et al. 2017) het vangstproces na lange tijd. Factoren die de overleving beïnvloeden zijn voornamelijk de water temperatuur en specifieke factoren gerelateerd aan het vaartuig. De individuele lengte van de soort bleek de overleving niet te beïnvloeden. Voor de berekening van het aantal proefdieren wordt met de overleving geen rekening gehouden omdat de mogelijke overleving van een individuele vis op het moment dat de proefdieren verzameld worden niet vastgesteld kan worden.

De gegevens over discards in de visserij worden aan boord van commerciële visserijsschepen verzameld. Dit wordt door zowel beroepsvissers zelf (discards zelfbemonstering), als door waarnemers van het onderzoeksinstituut (discards opstappers) gedaan. In 2009 is een herziening van de DCF (2008/949/EG) doorgevoerd, waarin lidstaten werd verzocht bemonsteringsprogramma's te intensiveren met als doel i) precisieniveau 's van schattingen van discards te verbeteren en ii) en het aantal bemonsterde vlootsegmenten te laten toenemen. Om aan de eisen van het DCF programma te voldoen is er besloten om de visserijsector te betrekken bij het verzamelen van deze gegevens. Door een 'referentievloot', bestaande uit commerciële vissersschepen, die op gezette tijden discards bemonsteren, kan aan deze eisen voldaan worden. Om de zelfbemonstering door de referentievloot te verifiëren worden ook wetenschappelijk waarnemers meegestuurd op een aantal van deze vissersschepen.

Tijdens de bemonstering aan boord van de vissersschepen worden discards verzameld tijdens het commercieel vangstproces. Dat wil zeggen dat de vis, gevangen in het vistuig, eerst aan boord komt en de discards pas bemonsterd worden nadat de bemanning de aanlandingen uit de vangst gesorteerd hebben. De vissen worden vervolgens gedood en meegenomen naar het lab waarna de otolieten verzameld worden en weefsels onderzocht worden.

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

---

Vissen worden gevangen met een commercieel visnet en worden na vangst aan boord gehaald. Dit is onderdeel van het commercieel vangstproces. De bemanning sorteert uit de vangst eerst de marktwaardige vissen.

Voor de zelfbemonstering door de beroepsvisserij wordt vervolgens door de beroepsvissers uit de vangst van een bepaald aantal trekken een representatief monster genomen van een hoeveelheid discards van circa 80 kg per trek. Dit monster wordt vervolgens op ijs opgeslagen in het vriesruim en later bij het instituut uitgezocht, waarbij alle dieren in de vangst, zowel bodemdieren als vissen gedetermineerd worden op soort en geteld. Van de vissen wordt de lengte gemeten. Een vijftal vissoorten (kabeljauw, wijting, tong, schol, en schar) worden later in het lab onderzocht voor biologische gegevens en de otolieten worden daar verzameld.

Bij de waarnemersreizen worden alle vissen in een bijvangstmonster op soort gedetermineerd, geteld en gemeten op lengte en worden van een aantal vissoorten random dieren geselecteerd per lengteklasse voor verder onderzoek. Deze vissen worden verzameld gedurende de reis en op ijs gelegd. Bij terugkomst in de haven worden deze vissen meegenomen naar het lab waarna de otolieten verzameld worden en andere biologische gegevens inwendig gedetermineerd worden.

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

---

Voor zowel de zelfbemonstering als de reizen bemonsterd door waarnemers wordt standaard van de soorten schol, tong, schar, kabeljauw en wijting, voor zover mogelijk is, een snijmonster van de discards verzameld, waarbij een vijftal individuen per lengteklasse verzameld. De proefdieren hebben over het algemeen een lengte onder de wettelijke minimum aanvoerlengte, welke varieert per vissoort (schol 27 cm, tong 24 cm, kabeljauw 35 cm en wijting 27 cm, voor schar geldt geen minimum aanvoerlengte). Heel zelden worden ook grotere individuen van deze soorten in de discards aangetroffen. Tijdens iedere visreis worden maximaal 5 vissen per lengteklasse per snijgebied (meestal wordt 1 gebied bevist per reis) verzameld uit de discards. Per jaar worden minimaal 170 (160 zelfbemonstering + 10 waarnemers) reizen bemonsterd.

Van alle soorten worden wellicht niet alle lengtegroepen gevangen en in de praktijk worden de soorten wijting en kabeljauw in kleine aantallen gevangen tijdens de reizen. Daarbij kunnen sommige van deze soorten zelfs ontbreken in een gebied. Bij het vaststellen van het aantal vissen bestaat daarom een verschil tussen het theoretische aantal proefdieren dat potentieel benut kan worden en het werkelijk aantal vissen dat jaarlijks zal benut worden voor het onderzoek. Omwille van bovenstaande redenen zouden de theoretische aantallen zoveel hoger uitkomen dan de werkelijke aantallen, dat dit onrealistische aantallen zou geven. In de aanvraag wordt om die reden voor de geschatte aantallen proefdieren beter uitgegaan van de gemiddeld gevangen aantallen gedurende de afgelopen drie jaar. Deze aantallen zullen echter van jaar tot jaar verschillen. Pas na de uitvoer van het onderzoek is het werkelijke aantal bekend.

Sinds 2016 is er in deze visserij een aanlandplicht voor discards. Dat betekent dat van bepaalde gequoteerde soorten (soorten waarvoor een vangstquota is vastgesteld) al die vis die eerst overboord ging, aangeland moet worden in de afslagen. Deze aanlandplicht wordt gefaseerd ingevoerd (onder voorbehoud): vanaf 2016 moet alle ondermaatse tong aangeland worden, vanaf 2018 zijn dit schol, wijting en kabeljauw en vanaf 2019 is dit schar. Dit zijn ook de soorten waarvan voor dit onderzoek door het instituut de weefsels onderzocht worden en otolieten genomen worden. Op deze nieuwe regelgeving zullen uitzonderingen in bepaalde gevallen (bijvoorbeeld hoge overleving van vissoorten in een bepaalde visserij) op scheepsniveau gegeven worden. Echter is momenteel onbekend of en hoe deze regelgeving toegepast gaat worden. Om zeker te zijn dat voldoende vissen aangevraagd worden, wordt in deze aanvraag uitgegaan dat voor alle vissoorten een uitzondering gemaakt zal worden. Indien dit niet het geval gaat worden en vissoorten volgens handelingen in de beroepsvisserij aan land gebracht moeten worden, zullen uiteindelijk minder dieren onder de titel "proefdier" vallen.

Vissen die behandeld worden volgens de bestaande visserijbedrijfsvoering en uiteindelijk dood zijn op het moment dat handelingen gedaan worden die ongerief overschrijdend zijn volgende de WoD, vallen buiten de WoD. Aan boord is het echter niet eenvoudig vast te stellen welke vissen al dood zijn en welke nog niet en om die reden worden alle vissen van een soort meegenomen in het aantal proefdieren.

## B. The animals

---

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

---

Het aantal vissen per jaar is bepaald op basis van eerder onderzoek over laatste drie jaar (2014-2016):  
Het betreft tenminste, maar niet uitsluitend, de vissoorten tong, schol, schar, wijting en kabeljauw.

Waarnemer: Maximaal 2.000 vissen per jaar  
Zelfbemonstering : Maximaal 7.750 vissen per jaar  
Totaal aantal vissen gevangen uit het wild:  $(2.000+7.750) \times 5 \text{ jaar} = 48.750$

Hier geldt wederom dat het werkelijk aantal vissen dat onderzocht gaat worden niet van tevoren te bepalen is en pas nadat het onderzoek uitgevoerd is dit bekend zal zijn.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
---------	--------	---------------------------	------------

## 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.

---

### C. Re-use

---

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: Om de leeftijden van vissen in de bijvangst te bepalen is het noodzakelijk om een representatief monster van de vangst te nemen en de gevangen dieren te doden. Vermindering: Het aantal monsters dat meegenomen wordt waarborgt dat voldoende informatie wordt verzameld om te voldoen aan de wettelijke eisen van gegevensverzameling onder de DCF en de daarin vastgelegde te behalen precisieniveaus. Daarnaast is het praktisch niet mogelijk voor de beroepsvissers en de wetenschappelijke waarnemer om het onderscheid te maken aan boord tussen vis die kan overleven, vis die later sterft ten gevolge van het vangstproces en vis die al ten tijde van het sorteren geen hersenactiviteit meer vertoont.

Verfijning: De dieren die gebruikt worden bij dit onderzoek zijn bijvangst van de beroepsvisserij. Zonder dit onderzoek zouden de dieren ook zijn gevangen. Voor de methode van doding van de nog in leven zijnde dieren wordt invriezen gebruikt; de vissen en bijgevangen bodemdieren worden in een viskist op ijs in een vriescel geplaatst. De vissen worden verzameld gedurende de visreis door uit de discards een representatief monster te nemen. Er kan niet redelijkerwijs verwacht worden van de beroepsvisser om de vissen individueel te moeten behandelen in de doding van de nog levende individuen omdat dit niet in hun commerciële bedrijfsvoering past. Dit is mede omdat het ontzettend lastig is om vast te stellen of een vis nog leeft, omdat vissen een comateuze toestand kunnen bereiken, waarbij zij nog wel spiercontracties laten zien. Het gebruik van verdovingsmiddelen is vanwege het feit dat het bemonstering van commerciële vissen ten behoeve van humane consumptie betreft (in dezelfde ruimte als waar de verwerking van deze voedselproductie plaatsvindt) niet wenselijk dan wel toegestaan i.v.m. voedselveiligheidseisen. Aangezien het programma zoals eerder benoemd afhankelijk is van de samenwerkingsvorm met de vissers is het geen optie om de bemanning te belasten met extra werk. De kans dat dit niet inpasbaar is in de bedrijfsvoering is zeer groot en beëindiging van de medewerking van de vissers is daarmee een reëel gevaar.

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

---

De dieren worden na vangst eerst natgehouden en vervolgens via opvoerbanden verwerkt om de snelheid van vangstverwerking zo snel mogelijk te maken. Dit is de reguliere werkwijze aan boord van visserij schepen. Verdoving met verdovingsmiddel wordt niet toegepast. Het op deze grote schaal

gebruiken van verdovingsmiddelen geeft problemen met afvoer van het middel en kans op nadelige milieueffecten (lekken naar het omringende water bij bijvoorbeeld ruige zee).

## 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.

---

Internationaal vindt afstemming plaats tussen de lidstaten, zodat lidstaten de discards van eigen vlootsegmenten bemonsteren.

## 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.

---

De dieren worden niet gehuisvest en verzorgd volgens de Richtlijn, omdat de dieren gevangen worden en zich enige tijd in een vistuig bevinden alvorens na vangst gedood worden aan boord van een schip.

### 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.

---

Aan boord van visserijsschepen.



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

---

Omdat de visserij niet anders uitgevoerd kan worden dan met de desbetreffende schepen. De visserij wordt uitgevoerd door de bemanning van het schip, de verwerking van de vangst door vissers en bevoegde medewerkers. De vissers zijn vooraf geïnstrueerd hoe de vangst voor deze proef verwerkt moet worden.

## 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.

---

Tijdens de vangst kan pijn worden ervaren door fysieke aanraking met objecten als stenen en schelpen en bij het omhoog halen van de vangst kunnen vissen gedrukt worden tegen de netwand of andere vissen of objecten onder het gewicht van de vangst. Dit is onderdeel van de beroepsvisserij, welke zonder dit onderzoek ook plaatsgevonden zou hebben. Hierbij is het niet mogelijk om pijnverlichtingsmethoden toe te passen.

Na vangst, en in geval van de waarnemerreis het sorteren, determineren per soort en lengtemetingen, worden de vissen geselecteerd voor het verkrijgen van monsters voor biologische gegevens. Omdat verwerking van de vissen uit de discards pas op het instituut plaatsvindt, worden de vissen gedood. Gebruik van een verdovingsmiddel op deze grote schaal en vaak aan boord van slingerende schepen in de nabijheid van commercieel verhandelde vissen levert problemen op met het veilig gebruik, de opslag en de afvoer van het verdovingsmiddel, waardoor dit niet gebruikt wordt.

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?

---

Vissen liggen tussen vangst en doding buiten het water, waarbij de ademhaling beperkt wordt en uitdroging van de huid plaats vindt.

Explain why these effects may emerge.

---

Doordat vissen eerst gesorteerd, gedetermineerd en gemeten moeten worden, zit er enige tijd zitten tussen vangst en doding.

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

---

De vissen zo snel mogelijk na selectie gedood.

### **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.

---

Indicate the likely incidence.

---

### **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 ).

---

Matig, gezien de vangstmethoden die gebruikt worden, de tijd tussen vangst en doding. Daarbij moet wel opgemerkt worden dat de vangst plaatsvindt tijdens reguliere beroepsvisserij en dat zonder het onderzoek de vissen ook gevangen zouden zijn tijdens deze visserij.

## **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.

---

Van de vissen worden leeftijdsstructuren, organen en weefsels genomen, welke zonder doding niet verkregen kunnen worden.

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.

---

Als methode van doding wordt invriezing middel het leggen en bedekken met ijs gebruikt, conform handelingen in de reguliere visserij, omdat de vissen pas op een later moment onderzocht worden. De volgens bijlage IV gestelde dodingsmethoden achten wij niet geschikt. Het inslaan van de hersenen geeft grote kans op beschadiging van de gehoorsteentjes en is bij lang niet alle vissoorten geschikt in verband met de harde schedel van sommige soorten. Gebruik van een verdovingsmiddel op deze grote schaal en vaak aan boord van slingerende schepen in de nabijheid van commercieel verhandelde vissen levert problemen op met het veilig gebruik, de opslag en de afvoer van het verdovingsmiddel, waardoor dit niet gebruikt wordt.

Yes

---

Appendix  
Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website [www.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.	WR	
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 4	Type of animal procedure Onderzoek weefsels en organen vis binnenwater

## 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 het binnenwater (zoet water) wordt onderzoek gedaan naar commercieel gevangen soorten als aal, baars, blankvoorn, brasem, snoekbaars en naar niet commercieel beviste vissoorten. De vissen die onderzocht worden zijn afkomstig van surveys (onderzoeksvisserijen) en vangsten verzameld bij beroepsvissers. Een survey is een gestandaardiseerde monitoring, waarbij jaarlijks wordt gevist gedurende dezelfde periode van het jaar met hetzelfde vistuig, op vooraf vastgestelde locaties met een gelijk aantal vistrekken van gelijke tijdsduur. Een selectie van vissen uit de vangst worden na vangstverwerking gedood voor het onderzoeken van leeftijdsstructuren (otolieten of schubben afhankelijk van de vissoort), organen en weefsels. De gegevens worden onder andere gebruikt voor toestandsbeoordelingen, ecosysteem- en voedselwebstudies.

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

---

Surveys worden uitgevoerd met zowel actief geviste vistuigen als passief staande vistuigen. Actief geviste vistuigen zijn bijvoorbeeld een boomkor, elektrostramienkor of elektroschepnet terwijl een passief geviste vistuig een staand want of fuik is. Een staand want is een verticaal staand kieuwnet waarin vissen inzwemmen en verstrikt raken achter de kieuwen of vast komen te zitten met vinnen. De trekduur met actieve vistuigen (kor, kuil of trawl) in het binnenwater is tussen 10 en 15 minuten, met elektroschepnet kan dit tot 30 minuten of langer zijn, afhankelijk van de lengte van het beviste stuk oever. Staand want wordt in de middag geplaatst en de volgende ochtend opgehaald.

Na vangst in het vistuig komt de vangst aan boord voor determinatie en lengtemetingen. Bij kleinere vangsten kan direct gemeten worden en worden de soorten tijdens het meten gedetermineerd. Bij grote vangsten wordt gewerkt met een representatief deel van de vangst ('subsample'). De vangst wordt gemeten op lengte door de vissen te leggen op een meetplank en de lengte af te lezen. Om een selectie te maken voor de vissen die nodig zijn voor onderzoek naar leeftijdsstructuren, organen en/of weefsel moet eerst de gehele vangst worden gedetermineerd, gesorteerd op soort en gemeten op lengte om de juiste aantallen proefdieren per centimeter per soort te krijgen. Vissen die niet onderzocht worden, worden weer teruggezet in het vangstwater na lengtemetingen. Afhankelijk van de vangst duurt het enkele minuten tot een half uur voor de vangst gesorteerd en de lengtes van de vissen gemeten zijn.

Om tot het beoogde aantal vissen te komen die nodig zijn voor het onderzoek, worden naast vissen uit de surveys ook vangsten van beroepsvissers bemonsterd, omdat hier veelal grotere vissen worden gevangen die met surveys niet altijd gevangen worden in grotere aantallen. Hiervoor worden beroepsvissers, die vissen met staand want, fuik of met een zegen bezocht. Een zegen is een lang net dat in een cirkel uitgevaren wordt en langzaam binnengehaald wordt, waarbij de vissen zich in een zak in het midden van het net verzamelen. Een representatief aantal vissen wordt opgekocht voor het onderzoek naar biologische gegevens (leeftijd, rijpheid, gewicht, lengte en geslacht). De vissen worden, indien deze nog leven, gedood. Bij het instituut worden de dode vissen opgeslagen in een vriezer voor analyse op een later moment.

Tevens wordt jaarlijks een selectie gemaakt van een aantal beroepsvissers waarvan de vangsten van aal bemonsterd worden. Een twintigtal beroepsvissers (circa tien IJsselmeer en circa tien overige gebieden in Nederland) worden twee keer per jaar bezocht. Naast het doen van lengtemetingen bij aal uit de vangst worden ook een aantal alen geselecteerd en meegenomen naar het laboratorium voor verder onderzoek naar biologische gegevens en het verkrijgen van otolieten. Hiervoor worden de alen bij de beroepsvisser in een grote transportbak gedaan met een overdosis verdovingsmiddel om de alen te doden. Bij het instituut aangekomen worden de dode alen opgeslagen in een vriezer voor analyse op een later moment. In het lab worden van de alen lengte en gewicht gemeten. Tevens worden otolieten afgenomen en worden organen en weefsels onderzocht (o.a. geslacht en geslachtsrijpheid en aanwezigheid van zwemblaasparasieten).

---

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

---

Voor vijf commercieel beviste soorten aal, baars, blankvoorn, brasem en snoekbaars worden monsters van vangsten van zowel surveys als vangsten van beroepsvissers onderzocht. Elk onderdeel (survey/beroepsvisserij) vangt een ander deel van de visgemeenschap (surveys meer kleine vissen, vangsten beroepsvissers meer grotere exemplaren) en vullen elkaar aan om een representatief overzicht te krijgen van de gehele lengterange van het bestand. Per lengteklasse groep (bijvoorbeeld de groep vissen die een lengte heeft tussen 5-10 cm) wordt een aantal vissen onderzocht voor weefsels en organen. Het aantal vissen dat per lengteklasse groep wordt onderzocht is onder andere afhankelijk van de vissoort (groeisnelheid, minimale lengte in de vangst en maximale lengte), vangstlocatie (leeftijdsopbouw van de soort in het beviste gebied). Het aantal te onderzoeken vissen is bepaald zodat de aantallen voldoende informatie geven over de leeftijdsopbouw van een soort, rekening houdend met de variatie in plaats en tijd. Voor overige soorten die niet commercieel benut worden door de beroepsvisserij, worden enkel vangsten vanuit de surveys onderzocht.

Bij het vaststellen van het aantal vissen dat onderzocht wordt kunnen, afhankelijk van de vangst, grote verschillen tussen het theoretische maximale aantal dat benut kan worden volgens het te hanteren protocol en het aantal vissen dat jaarlijks daadwerkelijk onderzocht wordt. Het theoretische potentieel te vangen aantal vissen wordt berekend op basis van de gehele vangbare lengterange van een vissoort. Dit wil zeggen: de lengte van het moment dat deze te groot zijn geworden om door de mazen van het net te ontsnappen en in het net achterblijven tot de maximale lengte dat een vissoort kan halen. In de praktijk wordt het theoretisch aantal proefdieren vaak niet gehaald. Zo komen grote vissen veel minder in de vangsten voor en kunnen lengteklassen of zelfs soorten ontbreken in het beviste gebied. De theoretische aantallen zouden zo veel hoger uitkomen dan de werkelijke aantallen, dat dit onrealistische aantallen zou geven. Omdat de bemonstering van de beroepsvisserij voor baars, blankvoorn, brasem en snoekbaars nieuw is en nog niet bekend is welke aantallen vissen per lengteklasse en welke lengteklassen bemonsterd kunnen worden per soort, zal bij in deze bijlage uitgegaan worden van de theoretische aantallen.

---

## **B. The animals**

---

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

---

De aanvraag omvat tenminste, maar niet uitsluitend, de volgende vissoorten van verschillende afmetingen en levensstadia uit wildvang:  
Aal (*Anguilla anguilla*), baars (*Perca fluviatilis*), blankvoorn (*Rutilus rutilus*), brasem (*Abramis brama*), pos (*Gymnocephalus cernuus*), snoekbaars

(Sander lucioperca), spiering (Osmerus eperlanus), zwartbekgrondel (Neogobius melanostomus).

Aantal per jaar maximaal 4.000, aantal per 5 jaar = 20.000 vissen

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
---------	--------	---------------------------	------------

---

### 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: het is niet mogelijk om het onderzoek te doen anders dan aan de desbetreffende vissoorten uit het wild. Het opkopen van (dode) commerciële vis van de afslag, in plaats van vis aan boord die nog in leven is, is soms een mogelijkheid maar heeft niet de voorkeur of is vaak niet een mogelijkheid, omdat veel vis niet via een afslag wordt verkocht en daarmee het onzeker is of voldoende maatse (boven de minimum aanvoerlengte) vis verzameld kan worden. Daarnaast geeft het opkopen van vis aan boord zekerheid dat alle vissen uit de vangst onderzocht worden en niet een selectie van de vangst welke op de afslag aangeboden wordt, wat mogelijk een onnauwkeurigheid in de gegevens kan geven. Daarnaast worden ook bij het onderzoek aan boord van beroepsvissers vissen meegenomen die onder de minimum aanvoer maat zijn. Deze zijn via de afslag niet beschikbaar. Tevens is het opkopen van vissen via de afslag (en daarmee het verminderen van het aantal proefdieren) een administratieve schijnoplossing. De meeste vissen komen via de beroepsvisserij (met uitzondering van vissen die levend doorverkocht worden voor bijvoorbeeld uitzet elders) uiteindelijk toch op de afslag en de vissen die voor het onderzoek bij beroepsvissers gedood worden, waren buiten ons onderzoek ook gedood voor consumptiedoeleinden. Ze zouden alleen dan niet onder de WOD vallen. Vermindering: Het aantal te onderzoeken vissen waarborgt dat per gebied voldoende vissen onderzocht worden om voldoende informatie op te leveren over de biologie en de leeftijdsopbouw van soorten. In 2013

is voor aal een pilot uitgevoerd om vast te stellen hoeveel monsters genomen moeten worden en hoe de monsternamen zou moeten worden gedaan. Aan de hand van deze pilot heeft in 2013 reeds een halvering van het aantal monsters plaatsgevonden dat tijdens de pilot gebruikt werd. Verfijning: Tussen het moment van vangst en het moment van doding zit enige tijd, doordat alle vissen in de vangst eerst vanuit het net aan boord gehaald worden, daarna eerst gedetermineerd op soort moeten worden en daarna op lengte gemeten. De vissen die geselecteerd worden voor het verkrijgen van biologisch materiaal worden pas na dit proces geselecteerd, omdat een select aantal vissen per lengteklasse gebruikt wordt. De overige vissen die niet geselecteerd zijn worden, worden weer overboord gezet (surveys) of zijn eigendom van de beroepsvisser mits de vis bovenmaats is (indien markt bemonstering). Omdat eerst determinatie en lengtemetingen moeten gebeuren is het niet mogelijk om vissen direct na de vangst te doden om de periode aan boord voor doding te verkorten. Indien mogelijk worden vissen natgehouden. Echter is dit wel afhankelijk van de omvang van de vangst en de mogelijkheden hiertoe aan boord.

---

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

---

De dieren worden zo snel mogelijk gedood na selectie.

## 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.

---

Jaarlijks wordt het onderzoek herhaald en wordt op dezelfde wijze gemonitord om trends en veranderingen in het bestand te kunnen vaststellen. Afstemming vindt plaats met opdrachtgevers om uit te sluiten dat andere gelijksoortige bemonsteringen op de locaties plaatsvinden.

## 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.

---



## **F. Accommodation and care**

---

De dieren worden niet gehuisvest en verzorgd volgens de Richtlijn, omdat de dieren gevangen worden en zich enige tijd in een vistuig bevinden en eventueel ook in opslag bij een beroepsvisser voor commercieel gebruik, alvorens voor onderzoek gedood worden.

## **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.

---

Aan boord van onderzoeksschepen of bij een beroepsvisser.

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

---

Omdat de visserij niet anders uitgevoerd kan worden dan met de desbetreffende schepen en vistuigen. De visserij wordt uitgevoerd door de bemanning van het schip, de verwerking van de vangst door bevoegde medewerkers. De alen afkomstig van beroepsvisseren vallen totdat de lengtemetingen gedaan worden en de vissen gedood voor verder onderzoek onder de bedrijfsvoering van de beroepsvisser. Nadat de medewerker de vissen bemachtigd van een beroepsvisser, worden deze zo snel mogelijk gedood.

# **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.

---

Tijdens de vangst kan pijn worden ervaren door fysieke aanraking met objecten als stenen en schelpen en bij het omhoog halen van de vangst kunnen vissen gedrukt worden tegen de netwand of andere vissen of objecten onder het gewicht van de vangst. Hierbij is het niet mogelijk om pijnverlichtingsmethoden toe te passen.

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?

De vis bevindt zich tevens enige tijd buiten het aquatisch milieu alvorens ze gesorteerd, gedetermineerd en gemeten worden.

Explain why these effects may emerge.

Doordat vissen eerst gesorteerd, gedetermineerd en gemeten moeten worden, kan er enige tijd zitten tussen vangst en doding.

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

Vissen worden na sortering, determinatie en meting zo snel mogelijk gedood.

### **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.

Indicate the likely incidence.

### **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 ).

---

Matig, gezien de vangstmethode die gebruikt worden welke speciaal voor onderzoek zijn ingezet en de tijd tussen vangst en doding. Bij surveys wordt het vangen speciaal voor onderzoek gedaan, bij beroepsvisserij valt het vangen van de vissen onder de bedrijfsvoering van de beroepsvisser. Daarbij moet wel opgemerkt worden dat de vangst plaatsvindt tijdens reguliere beroepsvisserij en dat zonder het onderzoek de vissen ook gevangen en veelal uiteindelijk gedood zouden worden voor consumptiedoeleinden.

## 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.

---

Van de vissen worden leeftijdsstructuren, organen en weefsels onderzocht, welke zonder doding niet verkregen kunnen worden. Omdat veelal geen otolieten afgenomen worden maar schubben bij zoetwatervissen en aal gedood worden door een overdosis verdovingsmiddel, zijn dodingsmethoden volgens bijlage IV wel geschikt.

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

---



[REDACTED]  
Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Wageningen  
University & Research

DATUM  
23 mei 2017

ONDERWERP  
aanvraag projectvergunning  
AVD4010020171304

ONS KENMERK  
AVD4010020171304

Geachte CCD,

Onderstaand het advies dat de DEC-WUR heeft gegeven aangaande het project  
"Onderzoek aan visbestanden"

#### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD4010020171304**
2. Titel van het project: Onderzoek aan visbestanden
3. Titel van de NTS: Onderzoek aan visbestanden
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:  
DEC-WUR  
[REDACTED]  
Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject  
Ontvangen door DEC: 26-04-2017  
Aanvraag compleet: 26-04-2017  
In vergadering besproken: 15-05-2017  
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  
Er is geen aanvullende correspondentie met de aanvrager geweest.

INTERNET  
www.wur.nl

KVK NUMMER  
09098104

E-MAIL  
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 mogelijk 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. Dit betreft de Natuurbeschermingswet indien er in het project sprake is van vangst van ondermaatse vis of beschermde soorten.
3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.

#### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van de aanvraag is het verzamelen van gegevens omtrent aard en omvang van visbestanden per leeftijdsgroep, toestandbeoordelingen, ecosysteem en voedselwebstudies t.b.v. beleidsadvisering.  
Het uiteindelijke doel van de aanvraag is te komen tot een zodanig beheer van visbestanden dat evenwichtige ecosystemen en duurzamer visserij gewaarborgd worden.  
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
  - Vissen: evenwichtige leeftijdsopbouw in een duurzaam ecosysteem
  - Predatoren van vissen: duurzame voedselvoorziening
  - Visserijsector: economisch belang
  - Onderzoeker/CRO: economisch belang
  - Maatschappij: morele verantwoordelijkheid voor een goed beheer t.b.v. een duurzaam, gebalanceerd ecosysteem
  - Overheid: betrouwbare gegevens voor onderbouwing van visserijbeleid
6. Voor zover de DEC dat kan inschatten is er geen sprake van substantiële milieueffecten.

#### *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. Men heeft reeds jarenlang ervaring met dit onderzoek.
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. 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. Dit project is een voortzetting van jarenlang, internationaal gecoördineerd en wettelijk voorgeschreven onderzoek waarbij de methodiek is vastgelegd.

#### *Welzijn dieren*

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
  - X Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - X Dieren in/uit het wild (10f)
  - X Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e, lid 2)
  - X Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
  - X Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
  - X Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
10. Er is in dit project geen sprake van huisvesting.
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: Vangst d.m.v. een net en verblijf buiten water.
12. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier, anders dan voortvloeiend uit de proefhandeling, met uitzondering van de roggen en haaien: die worden voorzien van een identificatietag.

13. Voor dit project zijn HEP's niet aan de orde gezien de korte tijd dat dieren gehanteerd worden en in verband met het doel van het project.

### 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. Vervanging is in de ogen van de DEC niet mogelijk omdat het onderzoek alleen in het doeldier uitgevoerd kan worden.
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. De onderzoeker heeft in de ogen van de DEC maximaal invulling gegeven aan vermindering door monsteraantallen terug te brengen en de aantallen dieren zo veel mogelijk te baseren op eerdere onderzoeksresultaten. Verdere vermindering zal de betrouwbaarheid voor adviezen schaden.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De onderzoeker past naar vermogen de mogelijkheden voor verfijning toe. De vissen worden na vangst nat gehouden.
17. Duplicatie in de tijd is voor dit project een vereiste om de trends te kunnen vaststellen. Er is geen duplicatie per tijdstip.

DATUM  
23 mei 2017

ONS KENMERK  
AVD4010020171304

PAGINA  
3 van 4

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

18. De vraag of beide sekses evenredig gebruikt worden is bij dit onderzoek niet van toepassing. Het betreft wildvang en er is geen sprake van surplusdieren.
19. De dieren worden gedood in het kader van het project. Dit is noodzakelijk voor het doel van het project. Hiervoor worden geëigende en op vissersboten bruikbare methoden toegepast die afwijkend zijn van de richtlijn. De DEC is van mening dat de onderzoeker hiervoor overtuigende argumentatie geeft.

### 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: Weegt het belang van voldoende betrouwbare gegevens omtrent aard en omvang van visbestanden, per leeftijdscategorie en grootteklasse ten behoeve van de daarop gebaseerde toestandbeoordelingen, voedselweb- en ecosysteemstudies op tegen het maximaal matig ongerief dat de maximaal 183.770 proefdieren wordt aangedaan?
- In haar beoordeling heeft de DEC geconstateerd dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. Het betreft internationaal gecoördineerd en wettelijk voorgeschreven onderzoek waarbij de methodiek is vastgelegd. In de afweging heeft de DEC meegewogen dat kennis uit het onderzoek bijdraagt aan het verkrijgen van gegevens omtrent visbestanden. Deze waarde van kennis beoordeelt de DEC als een reëel doel. Als het project zijn uiteindelijke doel haalt dan kan deze kennis bijdragen aan een onderbouwd evenwicht tussen visserij en ecosysteem. De DEC ziet een morele verantwoordelijkheid van de maatschappij voor een goed beheer van visbestanden t.b.v. een duurzaam, gebalanceerd ecosysteem. Het belang daarvan voor de vissen (individueel en als populatie) en dat van het ecosysteem is hierbij ingeschat als een reëel belang. Het economisch belang voor de visserij heeft de DEC ook meegewogen als een reëel belang. De onderzoeker/CRO heeft een economisch belang. De DEC heeft dit meegewogen als een beperkt belang. Tot slot zijn de waarden van de proefdieren in het geding. Het gaat hierbij om een maximaal matige aantasting van welzijn. De integriteit wordt in dit project, met uitzondering van de dieren die voorzien worden van een tag, niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef.
- Op basis hiervan is de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar visbestanden met maximaal matig ongerief voor maximaal 183.770 proefdieren. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal proefdieren of verfijning van de aanvraag. De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.

DATUM  
23 mei 2017

ONS KENMERK  
AVD4010020171304

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. Onderstaande knelpunten/dilemma's zijn naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies:
  - De DEC merkt op dat er hier sprake is van maximaal matig ongerief, maar dat in vergelijking met de gangbare visserij de proefdieren mogelijk zelfs minder ongerief ondervinden dan in de reguliere praktijk. De DEC onderschrijft desondanks de inschatting van de onderzoeker met betrekking tot het ongerief voor de vissen. Dit roept de vraag op naar de noodzaak van meer aandacht voor welzijn van vissen in de visserij. De Dec zelf heeft echter slechts zeer beperkte invloed op de wijze waarop de beroepsvisserij ingevuld wordt. De DEC ziet geen directe verantwoordelijkheid voor zichzelf om te sturen op de keuze voor de strategie aangezien die al plaatsvindt voor de indiening van het project. Zij kan in dit kader enkel signaleren. Vanuit dit perspectief heeft de DEC dit project beoordeeld: gegeven de huidige omstandigheden is de DEC van mening dat het project een bijdrage leveren aan het verbeteren van het in stand houden van een evenwichtig ecosysteem. De discussie over de wenselijkheid van een sterkere aandacht voor het welzijn van vissen en visserij-omstandigheden zal in een ander gremium dan de DEC gevoerd moeten worden.

Met vriendelijke groet,



secretaris DEC WUR



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research

██████████  
Akkermaalsbos 12  
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  
AVD4010020171304  
**Bijlagen**  
2

Datum 2 mei 2017  
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ██████████

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 1 mei 2017. Het gaat om uw project "Onderzoek van visbestanden". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD4010020171304. 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:**

2 mei 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD4010020171304

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**  
2 mei 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD4010020171304

### **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  
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]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

**Datum:**  
2 mei 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD4010020171304

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 januari 2018  
Geplande einddatum: 31 december 2022  
Titel project: Onderzoek van visbestanden  
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek van visbestanden  
Naam DEC: DEC Wageningen UR  
Postadres DEC: Droevendaalsesteeg 4 6708 PB Wageningen  
E-mailadres DEC: dec@wur.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.684,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Wageningen  
Datum: 1 mei 2017

**Datum:**  
2 mei 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD4010020171304



> 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  
AVD4010020171304  
**Bijlagen**  
2

Datum 2 mei 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 2 mei 2017  
Vervaldatum: 1 juni 2017  
Factuurnummer: 171304

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD4010020171304	€ 1.684,00

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

Akkermaalsbos 12  
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  
AVD4010020171304  
**Bijlagen**

1

Datum 8 juni 2017  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 1 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderzoek van visbestanden" met aanvraagnummer AVD4010020171304. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 7 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u vragen gesteld over het aantal dierproeven, met name welke dieren in de jaarregistratie van de NVWA worden opgenomen. Hierover hebben wij telefonisch contact gehad en u heeft bevestigd de gemaakte afspraken over registratie toe te passen.

### **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 "Onderzoek van visbestanden" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 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:**  
8 juni 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD4010020171304

### **Bezwaar**

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

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

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

### **Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

  
ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

### **Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

**Naam:** Stichting Wageningen Research

**Adres:** Akkermaalsbos 12

**Postcode en plaats:** 6700 AB WAGENINGEN

**Deelnemersnummer:** 40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Onderzoek van visbestanden" met aanvraagnummer AVD4010020171304, 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 1 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 1 mei 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 1 mei 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 23 mei 2017, ontvangen op 23 mei 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 7 juni 2017



**Aanvraagnummer:**  
AVD4010020171304

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1 Onderzoek weefsels en organen surveys zout</b>				
	Andere vissen (andere Pisces) / Verschillende vissoorten zoals beschreven in de bijlage dierproeven	114.020	100% Matig	
<b>3.4.4.2 Merken haaien en roggen tijdens surveys zout</b>				
	Andere vissen (andere Pisces) / verschillende soorten roggen en haaien	1.000	100% Matig	
<b>3.4.4.3 Onderzoek weefsels en organen bijvangst</b>				
	Andere vissen (andere Pisces) / verschillende vissoorten beschreven in de bijlage	48.750	100% Matig	
<b>3.4.4.4 onderzoek weefsels en organen vis binnenwater</b>				
	Andere vissen (andere Pisces) / verschillende vissoorten beschreven in de bijlage	20.000	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:**  
AVD4010020171304

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:**

AVD4010020171304

## Weergave wet- en regelgeving

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

**Aanvraagnummer:**

AVD4010020171304

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.

**Locatie**

De vergunning wordt verleend voor een project waarbij dierproeven geheel of gedeeltelijk worden verricht buiten een inrichting van een gebruiker (artikel 10g van de wet).

Inventaris Wob-verzoek W17-11										
nr.	document NTS 20171424	wordt verstrekt				weigeringsgronden				11.1
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g		
1	Origineel aanvraagformulier				x		x			
2	NTS initieel			x						
3	Projectvoorstel initieel				x	x	x	x		
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x						
5	DEC-advies				x		x			
6	Ontvangstbevestiging				x		x			
7	Verzoek om aanvullende informatie				x		x			
8	Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x			
9	NTS aangepast	x								
10	Projectvoorstel aangepast				x	x	x	x		
11	Bijlage beschrijving dierproeven aangepast			x						
12	Adviesnota CCD		x							x
13	Beschikking en vergunning				x		x			



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven

*Administratieve gegevens*

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

### 1 Gegevens aanvrager

<b>1.1</b>	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10700 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																
<b>1.2</b>	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Universiteit Maastricht</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>50169181</td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Minderbroedersberg</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>616</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6200 MD Maastricht</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL04 INGB 0679 5101 68</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Maastricht</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]	KvK-nummer	50169181	Straat en huisnummer	Minderbroedersberg	Postbus	616	Postcode en plaats	6200 MD Maastricht	IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht
Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]																	
KvK-nummer	50169181																	
Straat en huisnummer	Minderbroedersberg																	
Postbus	616																	
Postcode en plaats	6200 MD Maastricht																	
IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht																	
<b>1.3</b>	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Minderbroedersberg</td><td>4-6</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>616</td><td></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6200 MD Maastricht</td><td></td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL04 INGB 0679 5101 68</td><td></td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Maastricht</td><td></td></tr></table>	Straat en huisnummer	Minderbroedersberg	4-6	Postbus	616		Postcode en plaats	6200 MD Maastricht		IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht		
Straat en huisnummer	Minderbroedersberg	4-6																
Postbus	616																	
Postcode en plaats	6200 MD Maastricht																	
IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht																	
<b>1.4</b>	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[Redacted]</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td>[Redacted]</td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	[Redacted]	Functie	[Redacted]	[Redacted]	Afdeling	[Redacted]	[Redacted]	Telefoonnummer	[Redacted]	[Redacted]	E-mailadres	[Redacted]	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	[Redacted]																
Functie	[Redacted]	[Redacted]																
Afdeling	[Redacted]	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]	[Redacted]																
<b>1.5</b>	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>Functie</td><td>PhD Student</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td>[Redacted]</td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	[Redacted]	Functie	PhD Student	[Redacted]	Afdeling	[Redacted]	[Redacted]	Telefoonnummer	[Redacted]	[Redacted]	E-mailadres	[Redacted]	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	[Redacted]																
Functie	PhD Student	[Redacted]																
Afdeling	[Redacted]	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]	[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

IvD Maastricht

Dhr.  Mw.

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

██████████@maastrichtuniversity.nl

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

Ja  
 Nee

> Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag

## 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

01 - 05 - 2017

Einddatum

01 - 05 - 2022

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke

- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Therapeutische maatregelen om de gevolgen van herseninfarct te verminderen.

- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?

Naam DEC

DEC-UM

Postadres

Postbus 616, 6200 MD Maastricht

E-mailadres

██████████@maastrichtuniversity.nl

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
 Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- 

## 6 Ondertekening

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

Naam	[REDACTED]
Functie	[REDACTED]
Plaats	Maastricht [REDACTED]
Datum	13-4-2017
Handtekening	[REDACTED]





## Format

### Niet-technische samenvatting

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

### 1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Nieuwe therapeutische maatregelen om de gevolgen van herseninfarct te verminderen.
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	infarct, hersenschade, therapie

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	De voornaamste doelstelling van dit project is het ontwikkelen van een nieuwe therapie voor de behandeling van een herseninfarct, met een innovatieve combinatie van medicijnen. Een herseninfarct is de tweede meest voorkomende doodsoorzaak waarvoor slechts een enkel medicijn beschikbaar is: een bloedprop-oplossend middel. Dit medicijn kan echter maar voor ongeveer 15% van de patiënten worden ingezet omdat het meer dan 30 contra-indicaties heeft, en een hoog risico met zich meedraagt voor
---	---

fatale bloedingen. Wij willen een nieuwe therapie ontwikkelen waarbij met een combinatie van medicijnen schade aan de hersenen kan worden voorkomen. De medicijnen pakken alle drie hetzelfde ziekte-mechanisme aan, namelijk het verminderen van de vorming van schadelijke zuurstofdeeltjes. Ze werken echter op 3 verschillende punten in het proces en daardoor versterken ze elkaars effect. Het behandelingsprincipe dat wij willen toepassen is breed inzetbaar en heeft geen risico op bloedingen. Laboratoriumstudies en eerdere studies in kleine proefdieren hebben reeds aangetoond dat deze combinatie van medicijnen de hersenen beschermt tegen de gevolgen van een herseninfarct.

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

In dit onderzoek zullen we de nieuwe therapie testen in grote proefdieren, meer precies in schapen. Dit is een laatste, essentiële stap alvorens de therapie in klinische studies kan worden getest. Als de uitkomsten van onze studie ook in schapen laten zien dat er een beschermend effect is van de combinatie van medicijnen, kan deze therapie verder worden ontwikkeld voor gebruik in ziekenhuizen. Dit zou betekenen dat er voor het eerst een behandeling voor mensen met een herseninfarct beschikbaar komt, die schade aan de hersenen voorkomt en daarmee uitzicht geeft op een beter herstel en minder gevolgen voor de patiënt na het herseninfarct.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

17 volwassen schapen

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

De schapen zullen een chirurgische ingreep ondergaan, waarbij een herseninfarct wordt opgewekt door het tijdelijk afklemmen van een bloedvat. Hiermee bootsen we de verminderde of afwezige bloeddorstrooming tijdens een herseninfarct bij de mens na. Deze operatie kan het welzijn van het dier beïnvloeden. De operatie kan leiden tot pijn en benauwdheid en wondpijn na afloop. Door adequate pijnstilling en kunstmatige slaap worden deze negatieve gevolgen voor het welzijn beperkt. Antibiotica zullen worden gegeven om eventuele infecties te voorkomen/bestrijden. Daar het een model van het herseninfarct betreft, zullen de dieren ook de gevolgen daarvan ondervinden, net als bij mensen, zoals krachtsverlies en problemen met de motoriek.

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

Tweederde van de dieren (66%) zullen een gematigd ongerief ondervinden. De overige (33%) zullen mild ongerief ondervinden.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren zullen na afloop van het experiment worden gedood waarna de effecten van de nieuwe therapieën op de hersenschade uitgebreid geanalyseerd zullen worden.



## 4 Drie V's

### 4.1 **Vervanging**

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

De gevolgen van een herseninfarct zijn dermate complex en omvat meerdere organen en celtypes en kunnen niet nagebootst worden in proefdiervrije alternatieven. Onderzoek door middel van analyse van verzamelde gegevens en weefsels van patiënten, aangevuld met data uit reeds uitgevoerde dierexperimenten en laboratoriumexperimenten hebben geleid tot een selectie van therapieën die geschikt zijn voor verantwoorde preklinische studies die de situatie in de mens zoveel mogelijk benaderen. Deze experimenten in schapen zijn de laatste stap voordat de therapeutische interventie kan worden getest in patiënten, en zijn derhalve noodzakelijk om de stap naar klinische studies te maken.

### 4.2 **Vermindering**

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

Goede statistische onderbouwde studies die gebaseerd zijn op voorgaande experimenten en een gefaseerde uitvoering waarin de experimenten logisch op elkaar aansluiten, gekoppeld aan jarenlange ervaring van een gespecialiseerd onderzoeksteam staan garant voor een wetenschappelijk verantwoorde studie met een minimum aan schapen en een minimum aan ongerief.

### 4.3 **Verfijning**

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

De dierproeven zullen worden uitgevoerd in volwassen schapen. Eerdere studies in cellen en kleine knaagdieren hebben al gunstige effecten laten zien van onze voorgestelde therapie. Alvorens we de stap naar de kliniek kunnen zetten, is het testen van de therapie in een groter proefdier noodzakelijk. Er is gekozen voor schapen omdat deze qua grootte en gewicht overeenkomen met de mens. Het model dat wordt toegepast is een reeds bestaand en gevalideerd model dat het herseninfarct en de schade na een herseninfarct bij de mens goed nabootst. Daarnaast is het mogelijk om ook beeldvormende technieken te gebruiken die in de kliniek bij mensen kunnen worden toegepast.

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

Alle dieren krijgen adequate verdoving, pijnstilling en antibiotica om ongerief te voorkomen. Bovendien zullen de dieren zo lang mogelijk in hun natuurlijke omgeving gehouden worden om eventuele stress en angst te verminderen. Alle schapen zullen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn.

**5** In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



## 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10700
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Maastricht University
- 1.3 Provide the title of the project. Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke

## 2 Categories

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

## 3 General description of the project

### 3.1 Background

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

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

Stroke represents currently one of the largest unmet medical needs: It is the second leading cause of death and the first disability worldwide (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>). Almost 2 million people worldwide suffer from stroke every year and more than 1000 drugs have been pre-

clinically tested. However, all attempts to develop an effective drug therapy have failed. Currently, there is only one drug available, a blood-clot dissolving agent (rt-PA) (<http://www.stroke.org/we-can-help/survivors/just-experienced-stroke/stroke-treatments>). However, this drug has over 30 contraindications and bears an extremely high risk of causing fatal bleeding (1). Therefore, 85% of all stroke patients are not treated with it (2). In addition, it is a drug that is only used to take away the cause of the ischemia after it has already happened. There is currently no therapy available to diminish neurological damage to the brain after ischemia.

Therefore, there is a huge need of new therapeutic approaches and redefining drug discovery strategies. The needed innovation would be (i) a drug which is broadly applicable, i.e. has no contraindication, (ii) can be given in all forms of stroke and already in the ambulance, (iii) is safe, i.e. bears no risk to cause secondary bleeding, (iv) is effective and reduces the brain infarct, (v) increases survival and improves neurological outcomes for patients, (vi) and is directly neuroprotective reducing neuronal damage and apoptosis.

Our research addressed the biomedical concept of oxidative stress, i.e. the formation of reactive oxygen species (ROS) which is a fundamental consequence of aerobic life. The dogma was that such ROS are undesirable waste products and even triggers of disease. However, therapies building on so-called antioxidants were unsuccessful and even harmful (3). This therapeutic approach could show that the reasons for this were a fundamental misconception of the nature of ROS. In fact, ROS serve essential signaling roles in our body (4-7). Hence, it was to be expected that non-specific scavenging of all ROS with antioxidants must have negative consequences. It has been shown that a family of enzymes dedicated to ROS formation, specially NADPH oxidases (NOX) and NO synthase (NOS), is often the main source of ROS and are highly regulated post-ischemia (6, 8). However, we also identify instances where these enzymes become apparently deregulated and can indeed cause disease (9, 10).

By targeting specifically these conditions and only the enzyme subtypes involved with selective drugs together with selectively reversing the damage caused by unwanted ROS, we identified an entirely new approach to the oxidative stress theory and its medical exploitation. We have validated three independent drugs, i.e. NOX and NOS inhibition and sGC activation, that target the same signaling network, but at different positions, and exert a highly synergistic effect in small animal models of stroke, kidney damage or atherosclerosis (*data not published*). Out of the three above possible medical indications for this combination therapy, stroke has the highest unmet need and is therefore chosen for further translation into the clinic. These three drug principles have been validated during the last years in our research group both at the genetic and pharmacological level to be relevant in stroke (**see Figure 1**):

- NADPH oxidase (NOX), an oxygen radical forming enzyme family causing blood-brain barrier breakdown and damage to neurons, which can be prevented by NOX inhibitors (NOXi) (10). There is not enough scientific evidence showing NOX1 as a detrimental enzyme in stroke. Moreover, it has been recently shown that NOX2 seems to play no role in brain ischemia (11),

therefore, NOX inhibition as a therapeutic target will be primarily focus on isoforms 4 and 5. Moreover, it has been described that NOX4 is up-regulated after ischemia (**Figure 2**) what leads to massive ROS production and neuronal damage.

- Nitric Oxide (NO) synthase (NOS), usually a signalling enzyme, which however in stroke is interrupted and instead produces neurotoxic quantities of NO, which can be prevented by NOS inhibitors (NOSi) (9). Similarly to NOX, different NOS isoforms are also up-regulated after ischemia leading to nitrative impairment (**Figure 2**)
- Soluble Guanylate Cyclase (sGC), a protective enzyme, which upon stroke is oxidatively damaged (by both oxygen radicals and NO) to apo-sGC but a drug is available (sGCa), which re-activates this damaged enzyme and thereby is able to reverse or prevent the consequences (*in vivo data unpublished*).

Different representatives of each drug class (NOXi, NOSi, sGCa) were already identified and shown to be highly effective when given alone in different small animal models (9, 10) (**see Figure 3**). Combining the three principles prevents compensatory mechanisms and allows to lower the concentration (*or, in vivo, dose*) of each separate drug. In full combination, our approach, also named network pharmacology, will increase both the efficacy and safety, as the chances for side-effects are reduced by lowering the doses. As a preliminary study, we treated hippocampal brain slices subjected to an ischemic period with sub-threshold concentrations of NOXi, NOSi and sGCa resulting in a clear and significant increase in cell viability (**Figure 4**).

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



Our therapeutic principle, discovered in the course of the last years (ERC-ADG RadMed) fulfills all above mentioned criteria and is also an innovative approach because we reduce the risk by developing only a single compound by combining three compounds that target the same disease mechanism at different points. We here propose to conduct the final step as a proof of concept (PoC) before a first-in-man study in stroke with the major objective to complete phase III pre-clinical animal trial to provide robust pre-clinical findings for a first-in-man trial in stroke.

### **References**

1. Vandelli L, et al. (2015) Fibrinogen decrease after intravenous thrombolysis in ischemic stroke patients is a risk factor for intracerebral hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 24(2):394–400.
2. Stankowski JN, Gupta R (2011) Therapeutic targets for neuroprotection in acute ischemic stroke: lost in translation? *Antioxid Redox Signal* 14(10):1841–1851.
3. Schmidt HHHW, et al. (2015) Antioxidants in Translational Medicine. *Antioxid Redox Signal* 23(14):1130–1143.
4. Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82(1):47–95.
5. Kaludercic N, Deshwal S, Di Lisa F (2014) Reactive oxygen species and redox compartmentalization. *Front Physiol* 5:285.
6. Casas AI, et al. (2015) Reactive Oxygen-Related Diseases: Therapeutic Targets and Emerging Clinical Indications. *Antioxid Redox Signal* 23(14):1171–1185.
7. Ghezzi P, Jaquet V, Marcucci F, Schmidt HHHW (2016) The oxidative stress theory of disease: levels of evidence and epistemological aspects. *Br J Pharmacol*. doi:10.1111/bph.13544.
8. Radermacher KA, et al. (2013) Neuroprotection after stroke by targeting NOX4 as a source of

oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 18(12):1418–1427.

9. Kleinschnitz C, et al. (2016) NOS knockout or inhibition but not disrupting PSD-95-NOS interaction protect against ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab*:0271678X16657094.
10. Kleinschnitz C, et al. (2010) Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS Biol* 8(9):e1000479.
11. Kleikers PW, et al. (2015) A combined pre-clinical meta-analysis and randomized confirmatory trial approach to improve data validity for therapeutic target validation. *Sci Rep* 5:13428.
12. Stover JF, et al. (2014) Nitric oxide synthase inhibition with the antiplatelet VAS203 improves outcome in moderate and severe traumatic brain injury: a placebo-controlled randomized Phase IIa trial (NOSTRA). *J Neurotrauma* 31(19):1599–1606.
13. Pedernera C, Ruiz JL, Castells G, Manteca X, Cristòfol C (2007) HPLC quantification of perphenazine in sheep plasma: application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 854(1-2):308–312.

### 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?

As previously described, stroke is a public health problem with unmet medical needs which requires to be scientifically addressed. Following target identification and pre-clinical experiments using brain ischemia in vivo models, we have recently identified NOX, NOS and sGC as three promising therapeutic approaches against stroke. Therefore, the major research question is to demonstrate that a combinatory therapeutic approach by targeting different components of the NOX-ROS-cGMP oxidative stress pathway, reduces infarct volume and improves neuro-motor functioning and prognosis.

### 3.3 Relevance

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

Stroke caused 6.7 million deaths all over the world just in 2012 (WHO report). In the past decades, cerebrovascular diseases have emerged as an epidemic problem which are projected to keep growing in the coming years. Patients of all ages are affected by stroke, from newborn babies to adult patients and the lack of treatment options is also common to all ages. Therefore, there is a huge medical and social need of defining new therapeutic targets and further pharmacological treatments which allow direct improvement in patient outcome. Brain ischemia is a multi-factorial disease composed of several cell mechanisms leading to apoptosis, necrosis, neuronal death and significant tissue damage. Therefore, in stroke, extremely strong neuroprotection agents to maximally reduce brain tissue damage are required. Hence, a multi-factorial disease demands a complex multi-factorial approach which has been developed over the past decades in our group. We present a promising combinatory therapy that could prevent several pathomechanistic changes after stroke.

Therefore, the main purpose of this research project is to take the necessary step of a large animal study

for translating a novel innovative combination therapy for stroke to the clinics.

The end goal of the whole project is to meet a high medical need with an innovative drug combination in patients with stroke for which the animal study will give a proof of principle. The proposed animal study is in line with a long track record of *in vitro* and *in vivo* data which support the concept (see Figure 2).

### 3.4 Research strategy

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

The here proposed experiments are part of a larger continuum that started with *in vitro* models of brain ischemia (rat hippocampal brain slices subjected to oxygen glucose deprivation) and *in vivo* small animal experiments (other PV). We now want to proceed to the next step of a large animal before eventually going for clinical trials. In this PV, a stroke model will be employed in sheep. Drug dosing and administration routes are based on pre-existing pharmacokinetics and pharmacodynamics data in human for NOSi (12), in sheep for NOXi (13) and mouse data for sGCa (confidential company data).

#### 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.

Experiments in this PV will consist of an ovine experimental stroke model.

1. Before starting the surgery, all animals will be subjected to 2-weeks acclimation period. Within these weeks, a 7-day pre-test period will take place to ensure good animal health and provide baseline measurements.
2. To minimize variation with respect to age, 17 sheep at ~ 1 year of age (9 to 21 months) will be employed as an ovine model of transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO). The occlusion of the middle cerebral artery will last for 3.5 to 4 hours and subsequently reperfusion is allowed. This occlusion period usually leads to a profound core infarction, but still leave a considerable penumbra as a primary therapeutic target. Animals are intubated and anaesthetized via tracheal respiration. During surgery all physiological parameters are continuously monitored.
3. Following the ischemia period one group of animals will be injected with the combination of the previously selected drugs (NOXi, NOSi, sGCa). Similarly, a second group of stroke-operated animals will be treated with vehicle solution. A sham group will be used for assessing possible other effects of the treatment.
4. After surgery and treatment injection, animals will be monitored for 1 month including regular assessments of neurological functions, lesion volumetry, cerebral blood flow and metabolic state of brain tissue. In this 4-weeks surveillance period post-treatment, also possible side effects can be detected. However, the latter is highly unlikely as so far no relevant side-effects have been observed, including in the clinic (compounds used for other indications).
5. Finally, at day 28 all animals will be sacrificed and brains will be preserved for further molecular biology analysis.

#### 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.

Previous attempts to translate experimental neuroprotective therapies into clinically applicable therapies have been hampered by the translational roadblock. A particular promising solution to prove a particular

therapeutic concept is to conduct experiments in large animals. Those are not meant to repeat previous rodent work, but to verify obtained results in a gyrencephalic species, which exhibits a body weight and size similar to human patients which allows to use the same equipment and techniques as in humans. Moreover, large animals are feasible for imaging studies using clinical equipment and including sophisticated molecular imaging techniques which could help in pharmacological treatment validation. Next to addressing efficacy endpoints, large animals also provide additional safety information from a third species before ultimately moving forward to phase IIa clinical investigations. Although large animal experiments are significantly more laborious, they help to prepare early stage clinical trials. Thus, we will employ an ovine model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by a combinatory drug therapy which is able to modulate different pathomechanisms directly linked to neuronal damage and poor outcome.

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	Cerebral hypoxia-ischemia
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1

### General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10700	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Maastricht University	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 1	Type of animal procedure Cerebral Hypoxia-Ischemia

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

*We will use the ovine stroke model to test our combinatory neuroprotective therapy in a large animal species, as necessary step before proceeding to clinical trials. After the surgical procedure, animals will be kept within 4 weeks where infarct size, neurological function, cerebral blood flow and metabolic state will be used as outcome parameters. These parameters are clinically the most relevant to assess the effect of our neuroprotective therapy and can also be directly translated to a possible clinical trial afterwards.*

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

*We want to perform a stroke model in sheep by a transient occlusion of the middle cerebral artery (MCA). Briefly, the skin between the ear and eye was incised on the left side of the head to expose the branches of the superficial temporal artery and the accompanying vein. After occlusion of these vessels, the origin of the temporalis muscle was incised at the temporalis line and the muscle was carefully elevated from the parietal bone. After exposure of the skull bone surface, a hole is drilled into the parietal plate. On local incision of the dura mater, MCA or its branches are clipped during the ischemia period (3,5h to 4h. Then, the clip is removed after the desired ischemia time. Within 4h of tMCAO, vessel*

occlusion will be verified by intraoperative imaging (MRI/PET). During surgery and postoperative imaging, body temperature, blood pressure, heart rate, base excess, blood gas, as well as general anesthetic parameters will be recorded. Pre- and post-surgical antibiotic treatment will be administered.

Behavioral phenotype will be tested in the animals at the times -0.5h (before surgery), + 4h and + 12h after substance application. Already within the adaptation phase, the animals are thoroughly accustomed to dealing with the performing staff (for example, by recording clinical parameters and feeding), which means that necessary hand movements do not have a surprising effect on the animals during the experimental period. The behavior test itself does not cause any physical pain and is performed as gently as possible as well as in a quiet stable area. The burden of the animals by the planned behavioral test can be classified as very low.

Detailed procedure is as follows:

<b>Evaluation</b>	<b>Implementation/Execution</b>
1. Consciousness	Observation of the animal in calm and movement (animal responsiveness, communication with species, feed intake, etc.)
2. Attitude assessment a. Ataxia (uncoordinated movements) b. Torticollis (head skew) c. Overcutting (unphysiological footing on the fetlock joint)	Observation of the body (at rest and in motion) and gait with and without sight
3. Positioning and positioning reactions a. Correction reaction b. Bounce reaction c. Wheelbarrow test	a. Front and hind legs are passively overkilled by the examiner (foot on the fetlock joint) or placed on a stable support. Then, the support is carefully pulled to the side. The time for the correction to the physiological position is evaluated.  b. To be carried out with the front and rear legs (one leg each), in which case an extremity is lifted (no contact with the ground). By slow pressure or pull on the shoulder or the pelvis the animal reaches a relative oblique position (maximum 55° angle to the ground). The subsequent physiological correction by hopping with the opposing limb is examined and evaluated.  c. Raise the hindquarters by enclosing the flank. Both hind legs do not make contact with the soil. The animal only loads the front legs and is carefully pushed forward. The judgment of the posture of the head and of the step (front legs) and step direction is made.

After the surgery, animals will be monitored for 1 month while these behavioral tests were performed. Finally, at day 28 all animals will be sacrificed and brains will be preserved for further post-study necropsy and molecular biology analysis.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into

account to minimise the number of animals.

We will use a power analysis according to the formula  $n=2x s^2x (Z\alpha/2+Z\beta)^2/D^2$  (L. Sachs, *Angewandte Statistik*, Springer, 1983, Berlin, Springer Verlag), an  $\alpha$  of 0.05 and  $\beta$  of 0.8, a minimal statistically assessable treatment effect ( $D$ )=55% at a standard deviation ( $s$ )=30%, this implies that, at a power of 80%, the minimum number of animals is  $n=15,7 \times (s)^2/(D)^2$  per group.

## B. The animals

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

### Species and origin

Sheep will be used from the breeder who has been supplying the animal facility of the University of Maastricht. Animals from 9 to 21 months of age will be used to minimize variation with respect to age. As previously described, sheep studies are ethically less problematic than non-human primate experiments. Moreover, body weight and size in sheep are similar to human patients which allows to use the same imaging equipment and techniques as in human.

### Number of animals to be used

We will also taking into account a drop out of the stroke animals of 10% (mortality or excluded animals):  
 $n= 15,7 * 0,3^2/0,55^2 = 4,67/0.9 = 5,18 \sim$  **6 animals/group** and **5 animals/group** non considering drop-out (sham).

A total of 17 animals are foreseen to be used, allocated to 3 groups:

- Sham group ( $n=5$ )
- Stroke group with combination treatment ( $n=6$ )
- Stroke group with placebo ( $n=6$ )

## 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.

**Replacement:** Due to the complexity of cerebrovascular disorders, a complete **replacement** of animal experiments is still impossible without sacrificing human patient safety in the field. However, our research consortium has obtained relevant information on the therapeutic paradigm in previous in vitro studies, which were completed by selected and carefully performed in vivo (rodent) trials. Only those questions which necessarily need to be answered in large animal trials will be investigated.

Moreover, the use of sheep has been suggested by the European Medical Agency (EMA) to pharmaceutical companies in order to show in vivo the safety and feasibility of the new drug. It is unacceptable to test directly in humans based on exclusively in vitro data by the standards of EMA and

by good clinical practice.

**Reduction:** We use expert biomedical sample size calculation methodology for **reduction** of animal numbers to the required minimum. This is enabled by the focus on primary endpoints and derivation of relevant biomedical parameters from previous experiments. Due to large experience with sheep we are able to increase the number of animals that successfully reach the end of their experiments. Due to the expertise and experience of our team we have low numbers of drop-outs, which reduces the numbers of animals in the experimental groups. Our experiments are conducted by highly experienced personnel according to well-established protocols. In order to reduce the number of animals, we only use rams; since the female animals are better protected against hypoxia-ischemia it would be more difficult to see an effect of our therapy.

**Refinement:** For **refinement** our experiments, we rely on almost 1.5 decades of experience in the field, characterized by a continuous refinement of all experimental procedures, invasively or non-invasively, conducted to augment (i) animal welfare, (ii) reproducibility, (iii) external and internal validity, and (iv) translational relevance of the protocol. Experiments will be performed according to STAIR and, wherever possible, to ARRIVE criteria. Animals will be subjected to behavioral phenotyping, serial PET and MR imaging, frequent screening of physiological parameters and a detailed post-study necropsy to gain the maximum information yield possible from an individual experiment. Non-recovery experiments have been also considered, however, from a translational point of view, this approach does not make any sense when only clinically relevant endpoints such as infarct volume, behavior and brain metabolism can be investigated. This is almost impossible in non-recovery studies as (i) lesion development and functional recovery take time in the range of days to two weeks and (ii) observation periods >24h cannot be achieved in anesthetized subjects. Moreover, animals tend to become highly unstable under prolonged anesthesia (>12 hours). Our experiments will be conducted by a highly trained staff that can recognize and prevent discomfort. Moreover, we aim to leave the sheep as much in their natural environment as we can with minimal human contact.

---

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

Before induction of cerebral hypoxia-ischemia the sheep are kept in their natural environment as long as possible with access to food and water ad libitum. After induction of hypoxia-ischemia the sheep are housed in groups with access to food and water ad libitum.

The sheep will be checked daily for discomfort due to inflammation. Analgesia will be used during the whole procedure to reduce the animals' discomfort. Moreover, analgesia will be also applied to reduce sheep discomfort post-surgery for at least 4 days. Pre- and post-operative antibiotics will be administered, in order to prevent (progression of) (wound) infection.

The experiments will be performed by experienced animal technicians and researchers. This will speed up the progress of the experiment and therefore reduce animal suffering and fear (fast induction of anesthesia, fast surgery, and maximum results with minimal animal handling).

---

## 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.

*n.a.*

## 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

No

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

*After returning the animals to the stable, they are socially housed and are monitored clinically until they are completely re-awakened. For the further duration of the experiment, the animals are monitored twice a day, whereby at least once a day the general condition, respiratory rate, heart rate, body temperature and mucosal color are recorded according to the scoresheet.*

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

*Adequate analgesia will be applied to reduce sheep discomfort post-surgery for at least 4 days (1).*

*Ref: J. Henke et al. Expert information: Committee on Anaesthesia of GV-SOLAS. Pain management for laboratory animals. Status: May 2015.*

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

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

*Stroke is a severe disorder and the model procedure itself is demanding to the animal. Weight loss between 5 and 8% can be observed on occasion following very severe MCAO. The functional consequences of stroke are somewhat mitigated by the fact that pyramidal fibers do not cross completely in the ovine brain. Stroke therefore induces hemilateral weakness and slight motoric dysfunction, but does not*

leave the animal hemi-plegic or hemi-paralyzed as would be the case in primates including humane.

Wound infection can occur after all surgical manipulation, for which appropriate measures will be taken (antibiotics).

Survival rates of the MCAO procedure in sheep clearly exceed 90% under expert care and animals usually recover from post-surgical stress within 2 to 3 days.

Explain why these effects may emerge.

The neurological symptoms that we describe are inherent to the model used and are a sign of the ischemic damage to the brain.

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

All experiments will be conducted by a team of highly skilled veterinarians and bio-technicians. Trained veterinary assistants and bio-technicians will reinforce the team. The team relies on a sophisticated protocol of pre-, peri- and postsurgical stress and pain management, which has been refined together with experts from Animal Welfare agencies and senior veterinary experts over almost a decade. The protocol (details available upon request) relies on multi-drug treatment and is a fixed element in all sheep MCAO studies conducted by the team.

Moreover, animals will be subject to a 24-hour surveillance by veterinarians and/or trained bio-technicians with bihourly visits and welfare checks during the first two days after surgery. Thereafter, animals will be checked for at least three times a day and twice (until day 7) or once (thereafter) during the night.

All invasive procedures, imaging and animal transportation will be conducted under full anaesthesia/ventilation as well as continuous veterinary surveillance and assessment of vital science and physiological parameters.

## 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.

### **Humane endpoints:**

- Paralysis
- *Sepsis/ infection not responding to treatment:*
  - o **Local (at the site of operation):** redness, pain, and swelling (with or without pus) with local antiseptics or antibiotics are considered a humane endpoint. No improvement after antiseptics/antibiotics treatment after 10 days of treatment is also considered an endpoint.
  - o **Systemic:** Excessive lethargy, time lying down, weight loss > 15%
  - o **Stroke-related:** unable to eat, convulsions, stupor, inability to move
- *Untreatable pain: (a sheep that does not respond to analgesic treatment)*

Indicate the likely incidence.

Humane endpoints are seen in maximally 10% of the experiments

## 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').

<b>Intervention</b>	<b>Discomfort (Stroke groups – Placebo/treatment)</b>	<b>Discomfort (Sham group)</b>
tMCAO	2 (Mild)	2 (Mild)
Injection compounds	2 (Mild)	2 (Mild)
Survival after stroke	3 (Moderate)	2 (Mild)
Vital measurements	2 (Mild)	2 (Mild)
Neurological assessment	2 (Mild)	2 (Mild)
MRI	2 (mild)	2 (mild)
PET	2 (mild)	2 (mild)
Sacrificing	2 (Mild)	2 (Mild)
<b>Total discomfort</b>	<b>Moderate</b>	

### End of experiment

#### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The ram will be euthanized since we cannot reuse him since vital organs (i.e. brain) have to be sampled for analysis.

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

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

Yes

## DEC-advies PV 2016-017/ [REDACTED]

---

### Preambule:

De vragen en de bijbehorende antwoorden, **zie grijze markeringen**, doen wij U vertrouwelijk toekomen indachtig op artikel 10 lid 1 aanhef en onder f en g van de Wet Openbaarheid van Bestuur.

De DEC-UM verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de DEC-UM.

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 10700
2. **Titel van het project:** *Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke.*
3. **Titel van de NTS:** *Therapeutische maatregelen om de gevolgen van herseninfarct te verminderen.*
4. **Type aanvraag:**
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. **Contactgegevens DEC:**
  - naam DEC: *DEC-UM*
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]@maastrichtuniversity.nl
6. **Adviestraject** (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC; 15-02-2017
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken; 24-02-2017
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van / tot
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag
  - advies aan CCD
7. **Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.**

*De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD. Zie ook de verklaring van de vertegenwoordiger van de vergunninghouder onder punt 6 ondertekening van de aanvraag.*
8. **Eventueel horen van aanvrager: N.V.T.**
9. **Correspondentie met de aanvrager:**
  - Datum; 05-03-2017

- Gestelde vragen en antwoorden:

### **3 Algemene projectbeschrijving**

#### **3.1 Achtergrond**

##### **Algemene vragen/opmerkingen:**

1. De DEC UM verzoekt U de claims, gemaakt in deze paragraaf, wetenschappelijk te onderbouwen, bijvoorbeeld in de vorm van verwijzingen naar wetenschappelijke literatuur of in het geval van ongepubliceerde data: figuren uit eigen onderzoek die de claims ondersteunen.

De DEC-UM heeft derhalve moeite het belang en de waarde van het door U aangevraagde onderzoek in te schatten.

*Answer: Specific references regarding already published findings and preliminary data from our group are now include along the application.*

*Stroke is the second cause of death and the first one of disability worldwide. However, only 10% of the patients can be treated while the rest (90%) have no treatment option at all.*

*Therefore, there is a huge medical and social need of new pharmacological treatments which reduce neuronal damage and enhance motor outcomes post-stroke. Here, we present the first combinatory therapy for stroke which based on our preliminary data lead to direct neuroprotection and improved motor-functioning. Thus, we are addressing a high-priority social need within industrialized countries.*

##### **Voorbeelden zijn:**

1. U claimt dat er momenteel maar 1 medicijn beschikbaar is/geen behandeling is voor herseninfarcten. Heeft U hier wetenschappelijke verwijzingen over?

*Answer: There are several published studies where this statement is included. Some references and links to different websites are now included in the main proposal.*

2. U claimt dat ROS essentiële signaal moleculen zijn in ons lichaam, de gegeven referentie verwijst echter naar een artikel over het effect van vitamine E, een antioxidant, is dit de meest relevante literatuur op dit onderwerp?

*Answer: We definitely agree that the provided reference was not the most relevant in the field. More pertinent and suitable references are now included in the main proposal mainly focus on the physiological role of ROS in the body as a key signaling molecule and its potential pathological effect.*

3. U suggereert dat deze techniek operationeel is in Maastricht. Is zulks het geval? U suggereert dat Uw groep resultaten heeft behaald, maar verwijst vervolgens naar literatuur waarin Uw groep niet voor lijkt te komen? Kunt U onderbouwen of U de expertise heeft die benodigd is om dit onderzoek uit te voeren?

*Answer: We have a close collaboration with one of the most experienced groups in Europe with regard to stroke models in large animal experimentation. Our collaborators have been publishing several papers within the last years in this field. Therefore, our experienced collaborators will perform, lead and teach our group how all procedures should be properly conducted.*

4. U heeft het over NOS-remmers. Gaat U alle drie de vormen remmen of richt U zich specifieker op een van de drie NOS?

*Answer: Based on our preliminary in vitro data all three NOS isoforms (neuronal, endothelial and inducible) are up-regulated after ischemia (Figure 2a-b). Therefore, a global inhibition of NOS lead to a significant reduction of infarct volume (See Figure 3)*

5. U claimt dat glucose gevaarlijk is in ischemische hersenen, kunt U dit onderbouwen?

*Answer: It has been described in many clinical studies that glucose administration after brain ischemia leads to impair neuro-motor functioning and increased infarct volume.*

*However, we decided to remove this therapeutic approach from the application, therefore, all information about glucose has been deleted from the application.*

6. De DEC-UM zou hier graag een betere onderbouwing zien van wat men gaat geven en waarom, het lijkt een combinatie van 4 stoffen, maar op basis van welke data bent U tot deze keuze gekomen? U geeft aan dat NOX 1 en 2 niet zinvol zijn verder te onderzoeken, maar U richt zich nu in het algemeen op NOX en NOX5 remmers. Kunt U onderbouwen waarom op deze twee? Waarom verwacht U hier wel effecten?

*Answer: Since there are more than one question in this point we decided to split up the reply.*

- a) *We want to use a combination therapy including a NOXi, NOSi and sGCa in the same treatment as we describe in Figure 1. We based our target selection on years of experience in the field and robust in vitro data which validate the treatment as a promising therapy for stroke. This data is now included in Figure 4 together with a broad explanation in the figure legend.*
- b) *We are mainly focus on NOX4 and NOX5 because both isoforms play a major role in stroke pathophysiology. Based on the literature it is not clear whether NOX1 is involved in stroke since totally opposite data can be found. Regarding NOX2, we have been recently published a meta-analysis demonstrating that NOX2 play no role in stroke. Reference included in the main proposal.*
- c) *NOX4KO animals present a significant reduction in infarct size in comparison with control animals (reference included in the main proposal). Contrary, NOX5KI mice shows worst outcome after brain ischemia (paper in preparation), therefore we believe that NOX4 and NOX5 inhibition would be a promising therapy in large animals.*

### **3.2 Doel**

#### **Vraag:**

1. De DEC-UM vraagt zich af of de effecten zoals beschreven direct of indirect zijn, en maakt dat voor Uw hypothese iets uit, kunt u hierop uw visie geven?

*Answer: The effects of the model are clearly direct since we will evaluate less infarct volume using imaging techniques (MRI and PET) together with neuro-motor function assessment.*

### **3.3. Belang**

#### **Vragen:**

1. Hier schrijft U dat herseninfarcten op alle leeftijden voorkomen. Later in de aanvraag wordt duidelijk dat U de experimenten wilt doen in schapen van 1 jaar oud. Is dit de meest relevante leeftijd? Verwacht U dezelfde effecten in alle leeftijden? Is het denkbaar dat de combinatietherapie goed uitpakt bij bv. ouderen, maar gevaarlijk is voor neonaten?

*Answer: We will use animals from 9 to 21 months approximately. We need animals where the development of the brain is completed but not considered as elderly adults. In that case the structure and thickness of the skull is too thick making the access to the surgical area almost impossible. Moreover, the variability and standard deviation in these animals is much higher. Within this study we want to mimic as much as possible the human clinical situation where mostly elderly suffer from brain ischemia. The likelihood of neonates suffering from stroke is almost none, therefore, this combination treatment will be always used in adult animals.*

2. U claimt hier dat de hier voorgestelde dierstudie voort borduurt op jarenlange ‘track-record’ van *in vitro* en *in vivo* data die het concept ondersteunen. Kunt U de belangrijkste publicaties die deze claim ondersteunen als referentie opgeven?

*Answer: Validation of NOX4 and NOS as potential targets for brain ischemia has been published and all references are now included in the main proposal. Regarding the combinatory therapy, no complete set of data has been published yet due to confidentiality and patent issues. Therefore, we include Figure 4 (main proposal) where we describe the beneficial effect of the combinatory therapy using an in vitro ischemia model. Moreover, separate treatments with NOXi, NOSi and sGCa using an in vivo stroke model are also included in Figure 3.*

### **3.4.2**

#### **Algemene opmerking:**

1. De volgorde van de beschreven handelingen lijken willekeurig. Zou U dit aan willen passen naar een meer chronologisch geheel?

*Answer: We agree that the different procedures and handlings were not fully clear in terms of chronological distribution. We made some changes to solve this issue.*

#### **Vragen:**

1. U wilt de variatie minimaliseren door dieren te nemen van ca. 1 jaar oud. In hoeverre zijn hormonen van invloed op de effectiviteit van Uw therapie? Schapen van 1 jaar oud zijn qua levensfase vergelijkbaar met pubers. Is dit de meest relevante leeftijd voor uw onderzoek naar herseninfarcten? Hebben pubers de meeste herseninfarcten?

*Answer: As we previously mentioned, because of technical reasons we will use animals from 9 to 21 months approximately in order to perform reproducible and valid surgeries. Based on the clinical data, stroke mainly occurs in elderly people; however, due to technical issues it is not possible to perform the surgeries in elderly sheep.*

2. Waar gaat U precies op letten als het gaat om bijwerkingen?

*Answer: Since we do not expect any side-effect based on our preliminary in vivo experiments we will equally monitor treatment and vehicle animals mainly focusing on behavioral phenotyping and imaging measurements (PET, MRI) and compare the outcome obtained.*

3. Is het genoemde hersendeel het meest relevante hersendeel voor herseninfarcten, kunt U dat onderbouwen?

*Answer: Both hemispheres of the brain will be important for the late analysis after sacrificing since we should compare the stroked hemisphere with the non-stroked one. However, our main outcome will be focused on the reduction of infarct volume after the ischemia period. We will also collect brain tissue for later analysis such as WB, qPCR, IHC, etc.*

4. U beschrijft dat U alles in combinatie gaat testen, test U bijvoorbeeld ook glucose alleen, of alleen i.c.m. NOX? Zo nee, zou dat een waardevolle toevoeging kunnen zijn?

*Answer: As we previously said, we completely delete glucose from this proposal since the preliminary data was not clear at this point.*

### **3.4.4**

#### **Appendix 1**

#### **Algemene opmerkingen:**

1. De DEC-UM mist een beschrijving van de experimenten die U aanvraagt. Het is op dit moment daarom niet mogelijk in te schatten wat de welzijnsaantasting van de dieren zal zijn gedurende de experimenten.

*Answer: A detailed description of the animal procedure has been included in the appendix. I hope this explanation would help to a better understanding of the complete animal experiment.*

2. U beschrijft dat U neurologische metingen doet, welke en hoe scoort U die?

*Answer: Phenotype behavior link to neuro-motor function will be evaluated using different tests. Detailed explanations of the different tests/exercises have now been included in the appendix section A.*

#### **Vragen:**

#### **D. Vervanging, vermindering en verfijning.**

1. Onder ‘verfijning’ noemt U nogal wat handelingen die U wilt gaan doen met de dieren die niet eerder in het voorstel zijn benoemd. Dit moet onder onderdeel A al beschreven zijn. De DEC-UM vraagt U dit aan te passen.

*Answer: All handlings and animals procedures included in the refinement section have been included in the appendix, section A.*

#### **F. Huisvesting en verzorging.**

2. De DEC-UM zou hier graag meer informatie willen over de huisvesting van de dieren, met name na de operatie. Het is onduidelijk waar U de dieren in een groep zult gaan huisvesten en hoe U dan in staat zult zijn de dieren te monitoren.

*Answer: Detailed explanation about housing and monitoring the animals after the surgery have been included in the appendix, section F.*

3. U zegt hier voor het eerst dat U de dieren minstens 4 dagen pijnstilling zult geven. Eerder in het voorstel wordt gesuggereerd dat U de dieren gedurende het experiment analgesie zult geven. De DEC-UM vraagt U dit te verduidelijken.

*Answer: Analgesic treatment has been clarified and make it coherent along the appendix.*

#### **J. Humane eindpunten.**

4. Onder ‘local’: U zegt dat een humaan eindpunt bereikt wordt wanneer er geen verandering optreedt na toedienen van antibiotica. Binnen welk tijdsframe?

*Answer: Time-frame has been included in the appendix, section J.*

5. Onder ‘systemic’: hier leest de DEC-UM voor het eerst dat de dieren gewogen zullen gaan worden?

*Answer: Animals will be weighed before the surgical procedure. In case that after the surgical procedure the animals shows singles of deep weight loss, the sheep will be then weighted again. If the weight loss is >20%, it will be considered as an humane endpoint.*

6. Hoe weet men of een schaap pijn heeft?

*Answer: To evaluate whether the animals are suffering from pain, we will monitor systemic and phenotypic behavioral such as excessive lethargy, time lying down, weight loss >15%.*

7. De DEC-UM vraagt zich af hoe het komt dat U hier verwacht dat ongeveer 5% van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken, terwijl U bij het berekenen van de dieraantallen uitgaat van een uitvalspercentage van 10%, kunt U dat verschil toelichten?

*Answer: This mistake has now been solved in the appendix, section J.*

#### **K. Classificatie van ongerief.**

8. U geeft hier aan dat het totale ongerief dat U verwacht bij de dieren ‘mild’ is. In de bijgevoegde tabel is aangegeven, dat het overleven na het infarct, matig ongerief geeft. Het totale ongerief kan dan daarmee volgens de DEC-UM niet lager zijn dan ‘matig’ voor de dieren die een infarct hebben gehad. Verder vraagt de DEC-UM zich af of U de scans ook onder anesthesie zult doen? Wanneer doet u deze en hoe vaak?



*Answer: The expected total discomfort for the animals has now been changed in the appendix, section K. Regarding the scans, they will be done two times under anesthesia, the first one 1,5h after reperfusion and later before the sacrificing.*

- Datum antwoord; 07-04-2017
- Verstreckte antwoorden; zie hierboven.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

#### 10. Eventuele adviezen door experts: **N.V.T.**

## B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is. **JA**
2. De aanvraag betreft een **nieuwe** aanvraag.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **JA**
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. **N.V.T.**

## C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

*Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft zowel binnen de doelstellingen als tussen de doelstellingen criteria beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC-UM van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.*

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).

*Voor zover de DEC-UM de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om deze strijdigheid met andere wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC-UM wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-UM signalen bereiken aangaande mogelijke tegenstrijdigheid met wettelijke bepalingen dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.*

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Neveendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

*Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van translationeel onderzoek.*

*Belangen en waarden*

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

*Het directe doel van het project is aantonen dat, bij een beroerte, een combinatietherapie die verschillende onderdelen van het NOX-ROS-cGMP oxidatieve stress mechanisme beïnvloedt, het infarctvolume reduceert en het neuro motorisch functioneren en de prognose verbetert.*

*Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van een nieuwe therapie bij beroerte.*

*Het betreft hier een translationeel project.*

*Er is binnen dit project een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De DEC-UM acht het waarschijnlijk dat er belangrijke stappen richting het uiteindelijke doel gezet kunnen worden binnen de duur van dit project.*

*De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn.*

*Uit de aanvraag blijkt dat nieuwe therapieën bij beroerte noodzakelijk zijn om de levensverwachting te vergroten en het neuro motorisch functioneren van patiënten te verbeteren en dat daar op dit terrein ook behoefte aan is. Het therapeutische arsenaal bij beroerte is op dit moment beperkt. De DEC-UM is derhalve van mening dat het directe doel, het aantonen dat bij een beroerte een combinatietherapie die verschillende onderdelen van het NOX-ROS-cGMP oxidatieve stress mechanisme beïnvloedt, het infarctvolume reduceert en het neuro motorisch functioneren en de prognose verbetert, gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.*

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.

*De belangrijkste belanghebbenden in dit toegepast wetenschappelijke project, dat gericht is op het ontwikkelen van een nieuwe therapie bij beroerte, zijn de proefdieren, de onderzoekers, de doelgroep, d.w.z. personen die een herseninfarct hebben gekregen en hun naasten, de medische wetenschap en de maatschappij als geheel.*

*Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan. Ze zullen licht en matig ongerief ondervinden.*

*Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen medisch-wetenschappelijke kennis verkrijgen en delen met de medisch-wetenschappelijke gemeenschap. De onderzoekers vergaren kennis over de mogelijkheid om met een combinatietherapie, die verschillende onderdelen van het NOX-ROS-cGMP oxidatieve stress mechanisme beïnvloedt, de gevolgen van beroerte te beperken.*

*Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Verbeterde therapie en vergrote levensverwachting. Daardoor zal ook de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten.*

*Groei van medische kennis op een gebied waar daaraan behoefte is, wordt eveneens bevorderd door het onderhavige onderzoek. Herseninfarct is een belangrijke doodsoorzaak bij volwassenen en is ook een belangrijke oorzaak van neurologische schade met alle gevolgen voor de rest van het functioneren van dien. De therapeutische mogelijkheden voor patiënten met een herseninfarct zijn beperkt en in de laatste jaren ook niet verbeterd.*

*Mocht de onderzochte combinatietherapie een positief effect laten zien, dan zijn klinische studies met deze therapie op afzienbare termijn mogelijk. Vermindering van de gezondheidsschade van personen die een beroerte hebben gehad, kan ook gunstig zijn voor de maatschappij als geheel, door een verminderd beroep op de gezondheidszorg en betere mogelijkheden voor reïntegratie.*

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

*Voor zover de DEC-UM de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. De DEC-UM wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-UM signalen bereiken aangaande mogelijke effecten op het milieu dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.*

*Proefopzet en haalbaarheid*

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe.

*Voor zover de DEC-UM kan beoordelen is het vooral de samenwerking van de onderzoeksgroepen die de kennis en kunde hebben over dit experimenteel model en die het de onderzoeksgroep zal aanleren, mede gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering, alsmede de aandacht voor de drie V's.*

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe.

*De DEC-UM is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC-UM leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.*

*Welzijn dieren*

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe. **N.V.T.**
10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

*De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is op basis van de daartoe strekkende verklaring (in duplo) van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder, als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 der ondertekening van de aanvraag en punt F in de bijlagen.*

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe.

*De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.*

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit.

*De integriteit van de dieren zal worden aangetast door: De experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind van de proef.*

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe.

*Naar de mening van de DEC-UM zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.*

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe.

*De DEC-UM is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met de aangevraagde dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel.*

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe.

*Naar de mening van de DEC-UM is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat zulks mede gebaseerd op statistische analyse middels een poweranalyse.*

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe.

*De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen zonder dat dit het behalen van de doelstelling in de weg staat. Hierbij heeft de DEC-UM onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken.*

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe.

*Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.*

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

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd.

*De aanvrager zal in het project gebruik maken van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren. De DEC-UM is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken noodzakelijk is om de proeven met dergelijke dieren uit te voeren.*

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd.

*Naar de mening van de DEC-UM is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager.*

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. **N.V.T.**

*NTS*

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

*Naar de mening van de DEC-UM is zulks het geval.*

## **D. Ethische afweging**

1. Benoem de centrale morele vraag.

*Rechtvaardigt het onderzoeken van een veelbelovende combinatietherapie die schade aan de hersenen beperkt na een beroerte, de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke".*

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel.

Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: *matig nadeel*.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: *substantieel voordeel*.

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: *substantieel voordeel*.

Algemeen: *relevante groei van medische kennis*.

*De DEC-UM is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en van personen die zijn getroffen door een herseninfarct en hun naasten in het bijzonder binnen het project "Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke", zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot de dood na licht of matig ongerief.*

*De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan.*

*Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën bij beroerte. Voor patiënten en hun naasten is het belangrijk dat er therapieën beschikbaar komen die de schade ten gevolge van beroerte beperken. Dit vermindert het risico op overlijden en de ernst van de ziektelast voor patiënten en draagt zo bij aan de verbetering van kwaliteit van leven voor patiënten en hun naasten.*

*Er is op dit moment ook behoefte aan therapieën die de schade van een herseninfarct beperken, aangezien de toepasbaarheid van het huidige therapeutische arsenaal gering is. Mocht de onderzochte combinatietherapie ook bij grote proefdieren een positieve uitwerking hebben, dan kan deze therapie verder worden ontwikkeld richting toepassing in de kliniek.*

*Op grond van deze argumenten acht de DEC-UM het onderhavige onderzoek van substantieel belang.*

*Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.*

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

*De DEC-UM beantwoordt de centrale morele vraag: "Rechtvaardigt het onderzoeken van een veelbelovende combinatietherapie die schade aan de hersenen beperkt na een beroerte, de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke?" bevestigend.*

*Hoewel de DEC-UM de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren, weegt het substantiële belang van dit project naar haar mening zwaarder.*

*De DEC-UM is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.*

*Voor zover de DEC-UM kan beoordelen is het vooral de samenwerking van de onderzoeksgroepen die de kennis en kunde hebben over dit experimenteel model en die het de onderzoeksgroep zal aanleren. Er is geen sprake van duplicatie.*

*In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning.*

*De DEC-UM is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.*

*Er zijn voldoende go/no go momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden.*

*De DEC-UM is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.*

*Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-UM de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke" als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de DEC-UM het projectvoorstel "Targeting Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke" van een positief advies.*

## **E. Advies**

1. Advies aan de CCD  
 De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is **unaniem** tot stand gekomen.

Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project.

### **N.V.T.**

*Daarenboven is de DEC-UM niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.*



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

[Redacted]

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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

AVD1070020171424

**Bijlagen**

2

Datum 14 april 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 13 april 2017. Het gaat om uw project "Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1070020171424. 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:**

14 april 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1070020171424

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**  
14 april 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1070020171424

### Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10700  
Naam instelling of organisatie: Universiteit Maastricht  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 50169181  
Straat en huisnummer: Minderbroedersberg 4-6  
Postbus: 616  
Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT  
IBAN: NL04 INGB 0679 5101 68  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Universiteit Maastricht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

**Datum:**  
14 april 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1070020171424

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: PhD Student  
Telefoonnummer: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

E-mailadres: [REDACTED]@maastrichtuniversity.nl

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 mei 2017  
Geplande einddatum: 1 mei 2022  
Titel project: Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke  
Titel niet-technische samenvatting: Therapeutische maatregelen om de gevolgen van herseninfarct te verminderen.  
Naam DEC: DEC-UM  
Postadres DEC: Postbus 616, 6200 MD Maastricht  
E-mailadres DEC: [REDACTED]@maastrichtuniversity.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  
Overige bijlagen:  DEC-advies

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Maastricht  
Datum: 13 april 2017

**Datum:**  
14 april 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1070020171424



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht



Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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  
AVD1070020171424

**Bijlagen**

2

Datum 14 april 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 14 april 2017

Vervaldatum: 14 mei 2017

Factuurnummer: 171424

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1070020171424	€ 1035,-

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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  
AVD1070020171424

Datum 25 april 2017

Betreft Aanvulling aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 13 april 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke" met aanvraagnummer AVD1070020171424. 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:

### **Ondertekening**

Van uw aanvraag is het originele aanvraagformulier nog niet ontvangen. Wij hebben ook het aanvraagformulier met de 'natte handtekening' nodig. Wij verzoeken u het aanvraagformulier voorzien van de juiste handtekening en aan ons te sturen.

### **Onduidelijkheden**

De sham-groep zal licht ongerief ondergaan, dit betreft 5 dieren van de 17 ofwel 29% van de dieren. In de NTS is aangegeven dat 33% van de dieren licht ongerief zal ondervinden. Kunt u dit in de NTS aanpassen, of aangeven dat 33% klopt en dit uitleggen?

### **Leges**

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

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

**Datum:**  
25 april 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1070020171424

**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. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlagen:

- Melding bijlagen

[REDACTED]

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** woensdag 7 juni 2017 16:41  
**Aan:** 'Info-zbo'  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: Aanvulling AVD1070020171424

Beste [REDACTED]

de betaling is door interne communicatiefouten vertraagd, maar is nu voorzien voor aanstaande vrijdag.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

---

**From:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Sent:** woensdag 7 juni 2017 16:27  
**To:** [REDACTED]  
**Cc:** [REDACTED]  
**Subject:** RE: Aanvulling AVD1070020171424

Geachte [REDACTED],  
Op 13 april 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke" met aanvraagnummer AVD1070020171424. De CCD heeft een besluit genomen over uw aanvraag. De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de leges hebben ontvangen.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

[REDACTED]

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** dinsdag 6 juni 2017 18:19  
**Aan:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)  
**Onderwerp:** Aanvulling AVD1070020171424

Dear members of the committee,

Thank you very much for the comments. Please accept our apologies for the delay.



We have changed the percentages as indicated to 29% and 71 % respectively, as you have suggested. The changes are now highlighted in grey.

Please do not hesitate to contact us for any further questions.

Yours sincerely,

████████████████████

---

---

Geachte ██████████,

Op 13 april 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke" met aanvraagnummer AVD1070020171424. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In bijgaande brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,

████████████████████

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)



## 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10700
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Maastricht University
- 1.3 Provide the title of the project. Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke

## 2 Categories

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

## 3 General description of the project

### 3.1 Background

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

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

Stroke represents currently one of the largest unmet medical needs: It is the second leading cause of death and the first disability worldwide (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>). Almost 2 million people worldwide suffer from stroke every year and more than 1000 drugs have been pre-

clinically tested. However, all attempts to develop an effective drug therapy have failed. Currently, there is only one drug available, a blood-clot dissolving agent (rt-PA) (<http://www.stroke.org/we-can-help/survivors/just-experienced-stroke/stroke-treatments>). However, this drug has over 30 contraindications and bears an extremely high risk of causing fatal bleeding (1). Therefore, 85% of all stroke patients are not treated with it (2). In addition, it is a drug that is only used to take away the cause of the ischemia after it has already happened. There is currently no therapy available to diminish neurological damage to the brain after ischemia.

Therefore, there is a huge need of new therapeutic approaches and redefining drug discovery strategies. The needed innovation would be (i) a drug which is broadly applicable, i.e. has no contraindication, (ii) can be given in all forms of stroke and already in the ambulance, (iii) is safe, i.e. bears no risk to cause secondary bleeding, (iv) is effective and reduces the brain infarct, (v) increases survival and improves neurological outcomes for patients, (vi) and is directly neuroprotective reducing neuronal damage and apoptosis.

Our research addressed the biomedical concept of oxidative stress, i.e. the formation of reactive oxygen species (ROS) which is a fundamental consequence of aerobic life. The dogma was that such ROS are undesirable waste products and even triggers of disease. However, therapies building on so-called antioxidants were unsuccessful and even harmful (3). This therapeutic approach could show that the reasons for this were a fundamental misconception of the nature of ROS. In fact, ROS serve essential signaling roles in our body (4-7). Hence, it was to be expected that non-specific scavenging of all ROS with antioxidants must have negative consequences. It has been shown that a family of enzymes dedicated to ROS formation, specially NADPH oxidases (NOX) and NO synthase (NOS), is often the main source of ROS and are highly regulated post-ischemia (6, 8). However, we also identify instances where these enzymes become apparently deregulated and can indeed cause disease (9, 10).

By targeting specifically these conditions and only the enzyme subtypes involved with selective drugs together with selectively reversing the damage caused by unwanted ROS, we identified an entirely new approach to the oxidative stress theory and its medical exploitation. We have validated three independent drugs, i.e. NOX and NOS inhibition and sGC activation, that target the same signaling network, but at different positions, and exert a highly synergistic effect in small animal models of stroke, kidney damage or atherosclerosis (*data not published*). Out of the three above possible medical indications for this combination therapy, stroke has the highest unmet need and is therefore chosen for further translation into the clinic. These three drug principles have been validated during the last years in our research group both at the genetic and pharmacological level to be relevant in stroke (**see Figure 1**):

- NADPH oxidase (NOX), an oxygen radical forming enzyme family causing blood-brain barrier breakdown and damage to neurons, which can be prevented by NOX inhibitors (NOXi) (10). There is not enough scientific evidence showing NOX1 as a detrimental enzyme in stroke. Moreover, it has been recently shown that NOX2 seems to play no role in brain ischemia (11),

therefore, NOX inhibition as a therapeutic target will be primarily focus on isoforms 4 and 5. Moreover, it has been described that NOX4 is up-regulated after ischemia (**Figure 2**) what leads to massive ROS production and neuronal damage.

- Nitric Oxide (NO) synthase (NOS), usually a signalling enzyme, which however in stroke is interrupted and instead produces neurotoxic quantities of NO, which can be prevented by NOS inhibitors (NOSi) (9). Similarly to NOX, different NOS isoforms are also up-regulated after ischemia leading to nitrative impairment (**Figure 2**)
- Soluble Guanylate Cyclase (sGC), a protective enzyme, which upon stroke is oxidatively damaged (by both oxygen radicals and NO) to apo-sGC but a drug is available (sGCa), which re-activates this damaged enzyme and thereby is able to reverse or prevent the consequences (*in vivo data unpublished*).



Different representatives of each drug class (NOXi, NOSi, sGCa) were already identified and shown to be highly effective when given alone in different small animal models (9, 10) (**see Figure 3**). Combining the three principles prevents compensatory mechanisms and allows to lower the concentration (*or, in vivo, dose*) of each separate drug. In full combination, our approach, also named network pharmacology, will increase both the efficacy and safety, as the chances for side-effects are reduced by lowering the doses. As a preliminary study, we treated hippocampal brain slices subjected to an ischemic period with sub-threshold concentrations of NOXi, NOSi and sGCa resulting in a clear and significant increase in cell viability (**Figure 4**).



1h 1h 1h 1h 1h 4h 1h 1h



5  
10 µg/h

Diasto

S

BA

Right/Left ratio

Right/Left

Vehicle BAY 60

g

Vehicle BAY 60


Grip test S

h

Grip test score

Vehicle BAY 60

Vehicle BAY 60



Our therapeutic principle, discovered in the course of the last years (ERC-ADG RadMed) fulfills all above mentioned criteria and is also an innovative approach because we reduce the risk by developing only a single compound by combining three compounds that target the same disease mechanism at different points. We here propose to conduct the final step as a proof of concept (PoC) before a first-in-man study in stroke with the major objective to complete phase III pre-clinical animal trial to provide robust pre-clinical findings for a first-in-man trial in stroke.

### **References**

1. Vandelli L, et al. (2015) Fibrinogen decrease after intravenous thrombolysis in ischemic stroke patients is a risk factor for intracerebral hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 24(2):394–400.
2. Stankowski JN, Gupta R (2011) Therapeutic targets for neuroprotection in acute ischemic stroke: lost in translation? *Antioxid Redox Signal* 14(10):1841–1851.
3. Schmidt HHHW, et al. (2015) Antioxidants in Translational Medicine. *Antioxid Redox Signal* 23(14):1130–1143.
4. Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82(1):47–95.
5. Kaludercic N, Deshwal S, Di Lisa F (2014) Reactive oxygen species and redox compartmentalization. *Front Physiol* 5:285.
6. Casas AI, et al. (2015) Reactive Oxygen-Related Diseases: Therapeutic Targets and Emerging Clinical Indications. *Antioxid Redox Signal* 23(14):1171–1185.
7. Ghezzi P, Jaquet V, Marcucci F, Schmidt HHHW (2016) The oxidative stress theory of disease: levels of evidence and epistemological aspects. *Br J Pharmacol*. doi:10.1111/bph.13544.
8. Radermacher KA, et al. (2013) Neuroprotection after stroke by targeting NOX4 as a source of

oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 18(12):1418–1427.

9. Kleinschnitz C, et al. (2016) NOS knockout or inhibition but not disrupting PSD-95-NOS interaction protect against ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab*:0271678X16657094.
10. Kleinschnitz C, et al. (2010) Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS Biol* 8(9):e1000479.
11. Kleikers PW, et al. (2015) A combined pre-clinical meta-analysis and randomized confirmatory trial approach to improve data validity for therapeutic target validation. *Sci Rep* 5:13428.
12. Stover JF, et al. (2014) Nitric oxide synthase inhibition with the antiplatelet VAS203 improves outcome in moderate and severe traumatic brain injury: a placebo-controlled randomized Phase IIa trial (NOSTRA). *J Neurotrauma* 31(19):1599–1606.
13. Pedernera C, Ruiz JL, Castells G, Manteca X, Cristòfol C (2007) HPLC quantification of perphenazine in sheep plasma: application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 854(1-2):308–312.

### 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?

As previously described, stroke is a public health problem with unmet medical needs which requires to be scientifically addressed. Following target identification and pre-clinical experiments using brain ischemia in vivo models, we have recently identified NOX, NOS and sGC as three promising therapeutic approaches against stroke. Therefore, the major research question is to demonstrate that a combinatory therapeutic approach by targeting different components of the NOX-ROS-cGMP oxidative stress pathway, reduces infarct volume and improves neuro-motor functioning and prognosis.

### 3.3 Relevance

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

Stroke caused 6.7 million deaths all over the world just in 2012 (WHO report). In the past decades, cerebrovascular diseases have emerged as an epidemic problem which are projected to keep growing in the coming years. Patients of all ages are affected by stroke, from newborn babies to adult patients and the lack of treatment options is also common to all ages. Therefore, there is a huge medical and social need of defining new therapeutic targets and further pharmacological treatments which allow direct improvement in patient outcome. Brain ischemia is a multi-factorial disease composed of several cell mechanisms leading to apoptosis, necrosis, neuronal death and significant tissue damage. Therefore, in stroke, extremely strong neuroprotection agents to maximally reduce brain tissue damage are required. Hence, a multi-factorial disease demands a complex multi-factorial approach which has been developed over the past decades in our group. We present a promising combinatory therapy that could prevent several pathomechanistic changes after stroke.

Therefore, the main purpose of this research project is to take the necessary step of a large animal study

for translating a novel innovative combination therapy for stroke to the clinics.

The end goal of the whole project is to meet a high medical need with an innovative drug combination in patients with stroke for which the animal study will give a proof of principle. The proposed animal study is in line with a long track record of *in vitro* and *in vivo* data which support the concept (**see Figure 2**).

---

### 3.4 Research strategy

---

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

The here proposed experiments are part of a larger continuum that started with *in vitro* models of brain ischemia (rat hippocampal brain slices subjected to oxygen glucose deprivation) and *in vivo* small animal experiments (other PV). We now want to proceed to the next step of a large animal before eventually going for clinical trials. In this PV, a stroke model will be employed in sheep. Drug dosing and administration routes are based on pre-existing pharmacokinetics and pharmacodynamics data in human for NOSi (12), in sheep for NOXi (13) and mouse data for sGCa (confidential company data).

---

#### 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.

Experiments in this PV will consist of an ovine experimental stroke model.

1. Before starting the surgery, all animals will be subjected to 2-weeks acclimation period. Within these weeks, a 7-day pre-test period will take place to ensure good animal health and provide baseline measurements.
2. To minimize variation with respect to age, 17 sheep at ~ 1 year of age (9 to 21 months) will be employed as an ovine model of transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO). The occlusion of the middle cerebral artery will last for 3.5 to 4 hours and subsequently reperfusion is allowed. This occlusion period usually leads to a profound core infarction, but still leave a considerable penumbra as a primary therapeutic target. Animals are intubated and anaesthetized via tracheal respiration. During surgery all physiological parameters are continuously monitored.
3. Following the ischemia period one group of animals will be injected with the combination of the previously selected drugs (NOXi, NOSi, sGCa). Similarly, a second group of stroke-operated animals will be treated with vehicle solution. A sham group will be used for assessing possible other effects of the treatment.
4. After surgery and treatment injection, animals will be monitored for 1 month including regular assessments of neurological functions, lesion volumetry, cerebral blood flow and metabolic state of brain tissue. In this 4-weeks surveillance period post-treatment, also possible side effects can be detected. However, the latter is highly unlikely as so far no relevant side-effects have been observed, including in the clinic (compounds used for other indications).
5. Finally, at day 28 all animals will be sacrificed and brains will be preserved for further molecular biology analysis.

---

#### 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.

Previous attempts to translate experimental neuroprotective therapies into clinically applicable therapies have been hampered by the translational roadblock. A particular promising solution to prove a particular



therapeutic concept is to conduct experiments in large animals. Those are not meant to repeat previous rodent work, but to verify obtained results in a gyrencephalic species, which exhibits a body weight and size similar to human patients which allows to use the same equipment and techniques as in humans. Moreover, large animals are feasible for imaging studies using clinical equipment and including sophisticated molecular imaging techniques which could help in pharmacological treatment validation. Next to addressing efficacy endpoints, large animals also provide additional safety information from a third species before ultimately moving forward to phase IIa clinical investigations. Although large animal experiments are significantly more laborious, they help to prepare early stage clinical trials. Thus, we will employ an ovine model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by a combinatory drug therapy which is able to modulate different pathomechanisms directly linked to neuronal damage and poor outcome.

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	Cerebral hypoxia-ischemia
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1

### General information

- |     |  |                       |                           |
|-----|--|-----------------------|---------------------------|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10700                 |                           |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment.  | Maastricht University |                           |
| 1.3 | List the serial number and type of animal procedure.   | Serial number         | Type of animal procedure  |
|     |  | 1                     | Cerebral Hypoxia-Ischemia |

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

*We will use the ovine stroke model to test our combinatory neuroprotective therapy in a large animal species, as necessary step before proceeding to clinical trials. After the surgical procedure, animals will be kept within 4 weeks where infarct size, neurological function, cerebral blood flow and metabolic state will be used as outcome parameters. These parameters are clinically the most relevant to assess the effect of our neuroprotective therapy and can also be directly translated to a possible clinical trial afterwards.*

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

*We want to perform a stroke model in sheep by a transient occlusion of the middle cerebral artery (MCA). Briefly, the skin between the ear and eye was incised on the left side of the head to expose the branches of the superficial temporal artery and the accompanying vein. After occlusion of these vessels, the origin of the temporalis muscle was incised at the temporalis line and the muscle was carefully elevated from the parietal bone. After exposure of the skull bone surface, a hole is drilled into the parietal plate. On local incision of the dura mater, MCA or its branches are clipped during the ischemia period (3,5h to 4h. Then, the clip is removed after the desired ischemia time. Within 4h of tMCAO, vessel*

occlusion will be verified by intraoperative imaging (MRI/PET). During surgery and postoperative imaging, body temperature, blood pressure, heart rate, base excess, blood gas, as well as general anesthetic parameters will be recorded. Pre- and post-surgical antibiotic treatment will be administered.

Behavioral phenotype will be tested in the animals at the times -0.5h (before surgery), + 4h and + 12h after substance application. Already within the adaptation phase, the animals are thoroughly accustomed to dealing with the performing staff (for example, by recording clinical parameters and feeding), which means that necessary hand movements do not have a surprising effect on the animals during the experimental period. The behavior test itself does not cause any physical pain and is performed as gently as possible as well as in a quiet stable area. The burden of the animals by the planned behavioral test can be classified as very low.

Detailed procedure is as follows:

<b>Evaluation</b>	<b>Implementation/Execution</b>
1. Consciousness	Observation of the animal in calm and movement (animal responsiveness, communication with species, feed intake, etc.)
2. Attitude assessment a. Ataxia (uncoordinated movements) b. Torticollis (head skew) c. Overcatting (unphysiological footing on the fetlock joint)	Observation of the body (at rest and in motion) and gait with and without sight
3. Positioning and positioning reactions a. Correction reaction b. Bounce reaction c. Wheelbarrow test	a. Front and hind legs are passively overkilled by the examiner (foot on the fetlock joint) or placed on a stable support. Then, the support is carefully pulled to the side. The time for the correction to the physiological position is evaluated.  b. To be carried out with the front and rear legs (one leg each), in which case an extremity is lifted (no contact with the ground). By slow pressure or pull on the shoulder or the pelvis the animal reaches a relative oblique position (maximum 55° angle to the ground). The subsequent physiological correction by hopping with the opposing limb is examined and evaluated.  c. Raise the hindquarters by enclosing the flank. Both hind legs do not make contact with the soil. The animal only loads the front legs and is carefully pushed forward. The judgment of the posture of the head and of the step (front legs) and step direction is made.

After the surgery, animals will be monitored for 1 month while these behavioral tests were performed. Finally, at day 28 all animals will be sacrificed and brains will be preserved for further post-study necropsy and molecular biology analysis.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into

account to minimise the number of animals.

We will use a power analysis according to the formula  $n=2x s^2x (Z\alpha/2+Z\beta)^2/D^2$  (L. Sachs, *Angewandte Statistik*, Springer, 1983, Berlin, Springer Verlag), an  $\alpha$  of 0.05 and  $\beta$  of 0.8, a minimal statistically assessable treatment effect ( $D$ )=55% at a standard deviation ( $s$ )=30%, this implies that, at a power of 80%, the minimum number of animals is  $n=15,7 \times (s)^2/(D)^2$  per group.

## B. The animals

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

### Species and origin

Sheep will be used from the breeder who has been supplying the animal facility of the University of Maastricht. Animals from 9 to 21 months of age will be used to minimize variation with respect to age. As previously described, sheep studies are ethically less problematic than non-human primate experiments. Moreover, body weight and size in sheep are similar to human patients which allows to use the same imaging equipment and techniques as in human.

### Number of animals to be used

We will also taking into account a drop out of the stroke animals of 10% (mortality or excluded animals):  $n= 15,7 * 0,3^2/0,55^2 = 4,67/0.9 = 5,18 \sim$  **6 animals/group** and **5 animals/group** non considering drop-out (sham).

A total of 17 animals are foreseen to be used, allocated to 3 groups:

- Sham group ( $n=5$ )
- Stroke group with combination treatment ( $n=6$ )
- Stroke group with placebo ( $n=6$ )

## 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.

**Replacement:** Due to the complexity of cerebrovascular disorders, a complete **replacement** of animal experiments is still impossible without sacrificing human patient safety in the field. However, our research consortium has obtained relevant information on the therapeutic paradigm in previous in vitro studies, which were completed by selected and carefully performed in vivo (rodent) trials. Only those questions which necessarily need to be answered in large animal trials will be investigated.

Moreover, the use of sheep has been suggested by the European Medical Agency (EMA) to pharmaceutical companies in order to show in vivo the safety and feasibility of the new drug. It is unacceptable to test directly in humans based on exclusively in vitro data by the standards of EMA and

by good clinical practice.

**Reduction:** We use expert biomedical sample size calculation methodology for **reduction** of animal numbers to the required minimum. This is enabled by the focus on primary endpoints and derivation of relevant biomedical parameters from previous experiments. Due to large experience with sheep we are able to increase the number of animals that successfully reach the end of their experiments. Due to the expertise and experience of our team we have low numbers of drop-outs, which reduces the numbers of animals in the experimental groups. Our experiments are conducted by highly experienced personnel according to well-established protocols. In order to reduce the number of animals, we only use rams; since the female animals are better protected against hypoxia-ischemia it would be more difficult to see an effect of our therapy.

**Refinement:** For **refinement** our experiments, we rely on almost 1.5 decades of experience in the field, characterized by a continuous refinement of all experimental procedures, invasively or non-invasively, conducted to augment (i) animal welfare, (ii) reproducibility, (iii) external and internal validity, and (iv) translational relevance of the protocol. Experiments will be performed according to STAIR and, wherever possible, to ARRIVE criteria. Animals will be subjected to behavioral phenotyping, serial PET and MR imaging, frequent screening of physiological parameters and a detailed post-study necropsy to gain the maximum information yield possible from an individual experiment. Non-recovery experiments have been also considered, however, from a translational point of view, this approach does not make any sense when only clinically relevant endpoints such as infarct volume, behavior and brain metabolism can be investigated. This is almost impossible in non-recovery studies as (i) lesion development and functional recovery take time in the range of days to two weeks and (ii) observation periods >24h cannot be achieved in anesthetized subjects. Moreover, animals tend to become highly unstable under prolonged anesthesia (>12 hours). Our experiments will be conducted by a highly trained staff that can recognize and prevent discomfort. Moreover, we aim to leave the sheep as much in their natural environment as we can with minimal human contact.

---

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

*Before induction of cerebral hypoxia-ischemia the sheep are kept in their natural environment as long as possible with access to food and water ad libitum. After induction of hypoxia-ischemia the sheep are housed in groups with access to food and water ad libitum.*

*The sheep will be checked daily for discomfort due to inflammation. Analgesia will be used during the whole procedure to reduce the animals' discomfort. Moreover, analgesia will be also applied to reduce sheep discomfort post-surgery for at least 4 days. Pre- and post-operative antibiotics will be administered, in order to prevent (progression of) (wound) infection.*

*The experiments will be performed by experienced animal technicians and researchers. This will speed up the progress of the experiment and therefore reduce animal suffering and fear (fast induction of anesthesia, fast surgery, and maximum results with minimal animal handling).*

---

## **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.

*n.a.*

## 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

No

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

*After returning the animals to the stable, they are socially housed and are monitored clinically until they are completely re-awakened. For the further duration of the experiment, the animals are monitored twice a day, whereby at least once a day the general condition, respiratory rate, heart rate, body temperature and mucosal color are recorded according to the scoresheet.*

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

*Adequate analgesia will be applied to reduce sheep discomfort post-surgery for at least 4 days (1).*

*Ref: J. Henke et al. Expert information: Committee on Anaesthesia of GV-SOLAS. Pain management for laboratory animals. Status: May 2015.*

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

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

*Stroke is a severe disorder and the model procedure itself is demanding to the animal. Weight loss between 5 and 8% can be observed on occasion following very severe MCAO. The functional consequences of stroke are somewhat mitigated by the fact that pyramidal fibers do not cross completely in the ovine brain. Stroke therefore induces hemilateral weakness and slight motoric dysfunction, but does not*

leave the animal hemi-plegic or hemi-paralyzed as would be the case in primates including humans.

Wound infection can occur after all surgical manipulation, for which appropriate measures will be taken (antibiotics).

Survival rates of the MCAO procedure in sheep clearly exceed 90% under expert care and animals usually recover from post-surgical stress within 2 to 3 days.

Explain why these effects may emerge.

The neurological symptoms that we describe are inherent to the model used and are a sign of the ischemic damage to the brain.

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

All experiments will be conducted by a team of highly skilled veterinarians and bio-technicians. Trained veterinary assistants and bio-technicians will reinforce the team. The team relies on a sophisticated protocol of pre-, peri- and postsurgical stress and pain management, which has been refined together with experts from Animal Welfare agencies and senior veterinary experts over almost a decade. The protocol (details available upon request) relies on multi-drug treatment and is a fixed element in all sheep MCAO studies conducted by the team.

Moreover, animals will be subject to a 24-hour surveillance by veterinarians and/or trained bio-technicians with bihourly visits and welfare checks during the first two days after surgery. Thereafter, animals will be checked for at least three times a day and twice (until day 7) or once (thereafter) during the night.

All invasive procedures, imaging and animal transportation will be conducted under full anaesthesia/ventilation as well as continuous veterinary surveillance and assessment of vital science and physiological parameters.

## **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.

### **Humane endpoints:**

- Paralysis
- *Sepsis/ infection not responding to treatment:*
  - o **Local (at the site of operation):** redness, pain, and swelling (with or without pus) with local antiseptics or antibiotics are considered a humane endpoint. No improvement after antiseptics/antibiotics treatment after 10 days of treatment is also considered an endpoint.
  - o **Systemic:** Excessive lethargy, time lying down, weight loss > 15%
  - o **Stroke-related:** unable to eat, convulsions, stupor, inability to move
- *Untreatable pain: (a sheep that does not respond to analgesic treatment)*

Indicate the likely incidence.

Humane endpoints are seen in maximally 10% of the experiments

## **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').

<b>Intervention</b>	<b>Discomfort (Stroke groups – Placebo/treatment)</b>	<b>Discomfort (Sham group)</b>
tMCAO	2 (Mild)	2 (Mild)
Injection compounds	2 (Mild)	2 (Mild)
Survival after stroke	3 (Moderate)	2 (Mild)
Vital measurements	2 (Mild)	2 (Mild)
Neurological assessment	2 (Mild)	2 (Mild)
MRI	2 (mild)	2 (mild)
PET	2 (mild)	2 (mild)
Sacrificing	2 (Mild)	2 (Mild)
Total discomfort	Moderate	

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The ram will be euthanized since we cannot reuse him since vital organs (i.e. brain) have to be sampled for analysis.

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

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

Yes





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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

AVD1070020171424

**Bijlagen**

1

Datum 12 juni 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 13 april 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke" met aanvraagnummer AVD1070020171424. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 6 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Het aantal dieren dat licht ongerief zal ondergaan is verduidelijkt.

#### **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 "Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke" starten. De vergunning wordt afgegeven van 12 juni 2017 tot en met 1 mei 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-UM gevoegd. Dit advies is opgesteld op 13 april 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de

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

**Datum:**  
12 juni 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1070020171424

### **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



Algemeen Secretaris

### **Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Maastricht  
Adres: Postbus 616  
Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT  
Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 12 juni 2017 tot en met 1 mei 2022, voor het project "Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke" met aanvraagnummer AVD1070020171424, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-UM. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Professor experimental perinatology. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 13 april 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 6 juni 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 6 juni 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 13 april 2017, ontvangen op 13 april 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 6 juni 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1 Cerebral Hypoxia-Ischemia</b>				
	Schapen ( <i>Ovis aries</i> ) /	17	71% Matig 29% Licht	

### 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:**  
AVD1070020171424

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:**

AVD1070020171424

## Weergave wet- en regelgeving

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

**Aanvraagnummer:**

AVD1070020171424

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.

Inventaris Wob-verzoek W17-11										
nr.	document NTS 20171629	wordt verstrekt				weigeringsgronden				11.1
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g		
1	Origineel aanvraagformulier				x		x			
2	NTS initieel			x						
3	Projectvoorstel initieel				x	x	x	x		
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 initieel				x	x	x	x		
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 initieel				x	x	x	x		
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3 initieel				x	x	x	x		
7	DEC-advies				x		x			
8	Ontvangstbevestiging				x		x			
9	Verzoek om aanvullende informatie				x		x			
10	Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x			
11	NTS aangepast	x								
12	Projectvoorstel aangepast				x	x	x	x		
13	Bijlage beschrijving dierproeven 1 aangepast				x	x	x	x		
14	Bijlage beschrijving dierproeven 2 aangepast				x	x	x	x		
15	Bijlage beschrijving dierproeven 3 aangepast				x	x	x	x		
16	Verzoek om aanvullende informatie 2				x		x			
17	Bijlage beschrijving dierproeven 1 aangepast				x	x	x	x		
18	Bijlage beschrijving dierproeven 2 aangepast				x	x	x	x		
19	Bijlage beschrijving dierproeven 3 aangepast				x	x	x	x		
20	Adviesnota CCD		x							x
21	Beschikking en vergunning				x		x			

162g

1.



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

03 MEI 2017

- 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in   22100 <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 Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde KvK-nummer Straat en huisnummer Postbus Postcode en plaats IBAN
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Tenaamstelling van het rekeningnummer
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer E-mailadres
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer E-mailadres



- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters  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 - 9 - 2017
- Einddatum 1 - 9 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Research of new ruminant vaccines
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar nieuwe vaccins tegen ziektes bij herkauwers
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC
- Postadres
- E-mailadres

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.541 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- DEC advies  
 x Factuurinformatie

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening



## Format

### Niet-technische samenvatting

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

## 1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project | Onderzoek naar nieuwe vaccins tegen ziektes bij herkauwers
- 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Vaccin, immuniteit, rund, schaap, geit

## 2 Categorie van het project

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

## 3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- Binnen het project wordt onderzoek verricht naar nieuwe vaccins voor herkauwers (runderen, schapen en geiten). Vaccinatie tegen infectieziekten bij herkauwers levert een belangrijke bijdrage aan het verminderen van antibiotikagebruik. Een aantal ziekteverwekkers bij de herkauwers kunnen ook bij mensen ziekten veroorzaken. Door de herkauwers tegen deze ziekteverwekkers te vaccineren, wordt ook het risico op besmetting van de mens verlaagd.
- Het onderzoek is nodig om vaccins ter bescherming tegen nieuwe ziekteverwekkers waar nog geen vaccin voor is te ontwikkelen, maar ook voor verbetering van bestaande vaccins (bv aanpassing aan verandering van de ziekteverwekker in het veld, een verbeterde samenstelling of toedieningsroute of een combinatie van bestaande vaccins die het aantal vaccinatiemomenten vermindert).

Eerst wordt met onderzoek een nieuwe ziekteverwekker geïdentificeerd of kennis van een bekende ziekteverwekker uitgebreid en wordt vaccin kandidaat getest. Als deze vaccin kandidaat voldoet aan de benodigde veiligheid en werkzaamheid start de ontwikkeling. In deze fase worden studies gedaan met de nieuwe vaccin kandidaat om aan eisen voor Europese/internationale productregistratie voor nieuwe vaccins te kunnen voldoen.

Bij ontwikkeling van vaccins voor herkauwers worden ook andere diersoorten gebruikt om o.a. benodigde veiligheid te testen in andere dieren of voor ontwikkeling van laboratorium testen.

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

Beter werkende vaccins zullen bijdragen aan verdere vermindering van ziektes bij het dier en verbetering van het dierenwelzijn en de groei. Tevens zal de noodzaak en gebruik van alternatieve middelen als antibiotica verminderen. Door combinatie van vaccins zal het aantal vaccinatie momenten en/of de daarmee gepaard gaande stress verminderen. In geval van vaccins tegen ziekteverwekkers die ook mensen ziek kunnen maken zal het vaccin tegelijkertijd de voedselveiligheid verbeteren als ook de veiligheid voor de veehouder en medewerkers in de melk- en vleesverwerking .

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

<b>Diersoort</b>	<b>Aantallen</b>
<b>Runderen</b>	6565
<b>Schape</b>	1220
<b>Geiten</b>	210
<b>Konijnen</b>	700
<b>Muizen</b>	650
<b>Ratten</b>	650
<b>Cavia's</b>	550
<b>Kippen</b>	700

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

De dieren ondervinden licht ongerief van de entingen en bemonsteringen (bloedafname, rectal swab, neusswab etc.). Bij herhaalde bemonstering wordt het ongerief als matig ingeschaald. In het begin van een project worden infectiestudies met de ziekteverwekkers uitgevoerd om te onderzoeken welke ziekteverschijnselen en immuun reacties optreden. Op basis van deze studies worden ook de protocollen ontwikkeld om in een later stadium de werkzaamheid van een vaccin te testen. In deze infectiestudies krijgen gevaccineerde dieren ziekteverwekkers, waartegen het vaccin gericht zal zijn toegediend. In deze studies wordt ter vergelijking ook aan niet-gevaccineerde dieren dezelfde ziekteverwekker toegediend waarna deze dieren ziek kunnen worden. Afhankelijk van het ziektebeeld per ziekteverwekker zullen de ongevaccineerde dieren voor een korte periode matig tot ernstig ongerief kunnen ondervinden.

Infectiestudies kunnen ook nodig zijn om te onderzoeken of een potentieel vaccinstam afdoende verzwakt is.

Tevens worden diermodellen ontwikkeld, om de kwaliteit van de individuele batches van een vaccin voor de verkoop te controleren.

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

Licht: 15 %  
Matig: 76 %  
Ernstig: 9 %

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Doorgaans worden dieren geëuthanaseerd omdat er van een aantal weefsels bemonsterings genomen moeten worden, bv om deze onder het microscoop verder te onderzoeken. Indien dat niet het geval is kunnen, afhankelijk van de soort studie, dieren na beëindiging van een experiment teruggeplaatst

worden in de commerciële dier- en veehouderij, of hergebruikt. Ernstig zieke dieren of dieren waarbij het welzijn onverwacht is aangetast worden op een humane wijze geëuthanaseerd volgens geaccepteerde en wettelijk toegestane methoden.

## 4 Drie V's

### 4.1 **Vervanging**

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

De werkzaamheid van een vaccin hangt af van de reactie op het vaccin door het immuunsysteem van het dier en het vermogen van het geactiveerde immuunsysteem om later in de tijd een infectie te overwinnen. Dit is een dermate complex systeem dat er geen betrouwbare vervangende test zonder dieren voor is.

Waar mogelijk, dwz waar er een *in vitro* test is die correleert met bescherming en waar deze door de regulatoire autoriteiten wordt geaccepteerd, wordt hiervan gebruik gemaakt. Het is ons streven om hier zoveel mogelijk gebruik van te maken en ook in het voorafgaand onderzoek hier specifiek naar te kijken.

### 4.2 **Vermindering**

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

Voor zover van toepassing zullen de protocollen van de uit te voeren testen de richtlijnen inclusief de diersoort zoals vastgelegd in de Europese Farmacopee (wet- en regelgeving voor humane en veterinaire geneesmiddelen) of andere regulatoire regelgeving van overheden volgen. Het aantal benodigde dieren in de experimenten wordt statistisch doorgerekend, om niet te veel dieren te gebruiken maar tegelijkertijd wel de zekerheid te hebben dat de gegevens die uit het experiment komen, betrouwbaar genoeg zijn om conclusies uit te trekken ter voorkoming van herhalings-experimenten. Daarnaast worden dieren indien mogelijk opnieuw gebruikt met in acht neming van de bewaking van het dierenwelzijn en regelgeving.

### 4.3 **Verfijning**

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

Bij onderzoek naar nieuwe vaccins dienen de veiligheid en werkzaamheid van een product te worden aangetoond in het doeldier (in casu rund, schaap of geit). Daarnaast worden o.a. muizen, konijnen, cavia's en kippen gebruikt voor het opwekken van antilichamen en antisera voor testontwikkeling (mogelijk ter vervanging van diersstudies) en om de werkzaamheid van vaccin chargen te testen in het kader van de kwaliteitsbewaking.

Indien het toepassen van veterinaire behandeling (bijv pijnstilling) niet interfereert met het experiment zal daar waar mogelijk adequate veterinaire behandeling worden toegepast. Daarnaast worden er bij alle dierproeven vooraf vastgestelde humane eindpunten gehanteerd om het ongerief en lijden van dieren zo veel mogelijk te beperken.

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

De instelling beschikt over adequate gebouwen en voorzieningen om in de huisvestingsbehoefte van betreffende diersoorten te voorzien en om de procedures efficiënt uit te voeren met zo min mogelijk stress bij de dieren. De dieren worden sociaal (in groepen) gehuisvest en beschikken over kooiverrijking passend bij de diersoort zodat de dieren soort-specifiek gedrag kunnen uitvoeren.

Alle biotechnische handelingen en de dagelijkse handelingen voor de huisvesting en de verzorging van de dieren worden gedaan door

gediplomeerde en ervaren medewerkers.

Voor de controle en monitoring van het dierwelzijn beschikt de instelling over een Instantie voor Dierenwelzijn en gekwalificeerde dierenartsen waardoor passende veterinaire zorg te allen tijde beschikbaar is. Ernstig zieke dieren of dieren waarbij het welzijn onverwacht is aangetast worden op een humane wijze geëuthanaseerd volgens geaccepteerde en wettelijk toegestane methoden.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



## Form Project proposal

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

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

#### Rationale

Ruminants represent around 32% of the global animal health market, with vaccines being a key segment in the ruminant health market. This market is extremely diverse: the most important species of farmed ruminants are cattle, sheep and goat, but in certain regions, also buffalo, deer, and camels are raised in

an agricultural setting. The husbandry and management systems vary between species and also on whether the animals are kept for meat, milk or wool production. By consequence, a broad and diverse portfolio of ruminant vaccines is required to fulfil the specific needs for the different markets. One aspect is however constant across the whole ruminant health market: the trend of increasing animal productivity and growing farm/herd size, which is worsening the impact of infectious diseases. Vaccination is widely applied to control infectious diseases, leading to a reduction in the amount of antibiotics used and better wellbeing for the animals.

The company is constantly striving to strengthen its portfolio of ruminant vaccines by improving existing vaccines and developing new ones. New fields of vaccine research may include microorganisms that are by themselves harmless for ruminants, but animals are vaccinated to reduce the risk of infection for humans for example in case of [REDACTED] diseases or other zoonoses. Vaccination for other reasons such as [REDACTED] or other targets that are not infectious agents are out of scope for this application.

Each pathogen has its own specific mechanism of pathogenesis and protection through vaccination requires specific immune responses, either humoral, through cellular immunity, or a combination thereof. For this reason, new vaccines are to a large extent "tailor-made". Where possible, knowledge acquired with other pathogens / vaccines is used to design candidate vaccines in order to increase the likelihood of success and thereby minimize the numbers of animals needed during the whole development process of a new vaccine. Vaccines can be either live attenuated pathogens, (components of) inactivated pathogenes, [REDACTED].

Most inactivated vaccines are formulated together with an adjuvant and primarily induce a humoral response, while live (vector) vaccines typically induce both a humoral and cellular response. The attenuation of live vaccines can be accomplished by classical means (e.g. in vitro passaging or chemical mutagenesis) or by recombinant methods (GMO vaccines).

In case of diseases that affect very young animals, the mother is vaccinated in order to protect its offspring by the transfer of specific antibodies via the colostrum and milk or specific antibody preparations are added to the milk.

The two key requirements for any vaccine are (i) safety and (ii) efficacy. As vaccination is a medical treatment administered to healthy individuals, it is important that the vaccine does not cause undesired (negative) effects other than some transient minor discomfort. With regard to efficacy, the benefit in providing protection from disease and/or infection has to be demonstrated to justify the use. According to the applicable regulations in Europe and the majority of other countries, the safety and efficacy of a vaccine candidate has to be demonstrated in animal experiments. In addition, some quality control tests also require animal testing.

### Vaccine research and development

Within a vaccine project two phases can be distinguished: the research phase and the development phase.

The research phase comprises the search for new pathogens, new adjuvants, new vaccine formulations and new [REDACTED] methods as well as expansion of the knowledge on known pathogens and technologies. For example, mechanisms of pathogenicity and natural and specifically induced immune responses or strategies of the pathogens to [REDACTED] will be investigated, protective antigens might be identified or methods of attenuation of strains to create live vaccines might be investigated. Candidate vaccines are then tested in pilot studies to determine their efficacy and safety. Based on the outcome of these studies, candidate vaccines with a fixed formulation are selected to enter the development phase.

In addition, (antigenic components of) the pathogens will be used to immunize laboratory animals to generate antibodies that can be used to set up immunological assays that are needed during the development phase

The current project proposal covers studies that are done during the research phase. The development phase is covered by a separate project proposal.

In general, the design of the development studies, including the procedures that have to be applied to demonstrate safety and efficacy of the vaccine are laid down in Guidelines and Regulations. The design and the procedures applied in the research studies are basically the same as for the development studies:

- Infection studies with new pathogens are performed to set up target animal infection models that can be used in efficacy studies in the development phase and to expand the knowledge on these



pathogens with regard to pathogenesis, immune responses, etc.

- Safety and efficacy research studies are performed in order to select vaccine candidates that are likely to successfully pass the development studies
- The objective of studies on *in vivo* potency testing during the research phase is to set up a test protocol for an *in vivo* potency test that can be applied during the development phase.

During the research phase, less knowledge and experience is available on the different pathogens / vaccine candidates / adjuvants. Therefore, higher discomfort scores may be reached in a larger proportion of animals.

A distinct type of studies is the immunization of laboratory animals to generate specific antibodies that can be used for immunological assays that are needed the identification, detection and/or quantification of the antigen/pathogen. The commonly applied design and procedures are followed in these studies.

Below, some back-ground information is given about infectious diseases in ruminants that are in scope for this project.

### **Diseases within the ruminant vaccine development project**

Currently, the main target species for ruminant vaccines are cattle, yet several cattle pathogens also affect sheep and goat. In these cases, testing in small ruminants might also be necessary, especially in case of zoonoses or animal pathogens that are subject of control programs. Moreover, small ruminants might serve as model for infection studies.

The following infectious diseases are targeted within the ruminant vaccine development projects in the company.

[Redacted content]



A

[Redacted text block 1]

[Redacted text block 2]

[Redacted text block 3]

[Redacted text block 4]

[Redacted text block 5]

[Redacted text block 6]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



vaccines against emerging diseases. Also, combinations of diseases can be encountered more effectively, with fewer vaccination moments (injections), when vaccines are developed that can be used at the same time or mixed with other vaccines, or even in ready to use combination products.

The prospects are that the new vaccines will further reduce animal suffering and the use of antibiotics, and will lead to reduced losses in meat and milk production and thereby to a more sustainable use of natural resources.

Acquired insight in pathogenesis and immune responses of infections will help to identify new vaccination strategies for those pathogens for which no efficacious vaccine exists at this moment.

---

### **3.4 Research strategy**

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

Infection studies in the target animal (ruminants) have to be undertaken to show that a (newly isolated) infectious agent is pathogenic and fulfils Koch's postulates and to better understand the mechanisms of pathogenicity and immune response after infection. These infection studies can also form the basis for a target animal (ruminants) infection model that will be used to test the efficacy of vaccine candidates (vaccination-challenge studies). Such an infection model is needed to be able to show that a vaccine is capable to prevent or significantly reduce infection and/or clinical signs. For vaccines against some pathogens, the infection model that has to be used and the specific efficacy criteria that have to be fulfilled are prescribed in a monograph of the Ph.Eur. When doing (initial) vaccination-challenge studies, it is attempted to find an [REDACTED] so that in further studies efficacy can be evaluated on the basis of e.g. the [REDACTED]

Safety of vaccine candidates has also to be evaluated in the target animals (ruminants) to show that systemic and local (injection site) reactions after vaccination, if any, are acceptable. For each new vaccine, a risk-benefit analysis has to be made and the aim is to induce as little as possible discomfort by vaccination.

In the research phase, safety and ([REDACTED] efficacy parameters are measured simultaneously in combined orientating efficacy and safety studies.

---

#### **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.**

The research phase for new vaccine consist of one or more of the following types of animal experiments (described in detail in appendices 1 through 3).

##### **Ad 1) Infection studies**

An infection model for a pathogen is developed based on the scientific literature or a Ph.Eur monograph (if available) and the experience with other pathogens within the company. In a model, it will be attempted to reproduce the clinical signs that are associated with a certain disease or syndrome. For a potentially new pathogen this will reveal if it is indeed able to induce disease (Koch's postulates). For known pathogens the model has to allow assessment of the efficacy of vaccine candidates under controlled laboratory conditions as described in Ph.Eur 5.2.7 (Evaluation of efficacy of veterinary vaccines and immunosera) or vaccine specific monographs, EU Directive 2009/9/EC amending Directive 2001/82/EC (Community code relating to veterinary medicinal products) and national guidelines and regulations outside the EU. New infection models are defined as models for newly discovered (potential) pathogens or published models that have not been used within [REDACTED] before. Improvement or refinement of existing models will be undertaken in case not all disease characteristics that are relevant for the field situation are presented in the model, or if the model shows a high variability in the level of infection/pathology within a group of infected animals and which would therefore necessitate the inclusion of large groups of animals in infection-challenge experiments in order to be able to show statistically significant differences. In case of [REDACTED] diseases, it might be necessary to mimic the [REDACTED] effect of [REDACTED] factors in order to reach the required sensitivity of the animals to the challenge infection with a single pathogen. For this purpose, [REDACTED] drugs might be applied or the animals are co-infected with [REDACTED] pathogens.

Testing of new serotypes/pathotypes of a pathogen is also considered improvement rather than development of a new model, as the route of application etc. will be based on experience present within the company. Furthermore, refinement will also include the testing of modifications to a model with the intention to increase animal welfare (e.g. a less invasive application method).

Studies to investigate the pathogenicity and / or to develop or improve an infection model will have the following set-up:

- Administration of a (potential) pathogen, if required in combination with [REDACTED] treatment
- Observation of clinical signs post infection/sampling (e.g. for shedding of the pathogen, immune responses against the pathogen)
- Necropsy to investigate (histo)pathological changes

The degree of discomfort will depend on the nature of the pathogen involved as the infection model is supposed to mimic the natural disease as much as possible.

#### Ad 2) Vaccination studies

Once an infection model has been established, the efficacy of candidate vaccines against a pathogen can be evaluated. When looking into the options for vaccination against a newly discovered pathogen or a pathogen for which no vaccine is available, the vaccine candidate(s) to be tested are based on the scientific literature and the knowledge within the company on pathological processes, immune mechanisms and vaccines against related pathogens to have the highest chance of success and thereby minimize the number of animals needed. This will determine whether a live or inactivated vaccine approach will be taken. In some instances, there will be collaboration with outside partners (e.g. universities) that have specific knowledge on a (new) pathogen and that might even already have prepared and tested vaccine candidates. In addition, research on new (combination) vaccines for pathogens that are already being controlled by vaccination will also be guided by the experience gained under field conditions with the marketed product(s). An inactivated vaccine can be a whole killed microorganism or virus, or an immunogenic part of the pathogen (subunit vaccine). Also [REDACTED] vaccines or vaccines [REDACTED] fall into this category. An inactivated vaccine will be formulated with an adjuvant that is expected to be safe in the target animals (ruminants) and if applicable the laboratory animal used for the potency testing in combination with the chosen antigen(s) and will be quality control tested (e.g. for sterility) before the start of an animal experiment to reduce the chances of unwanted vaccination reactions. A live vaccine is an attenuated form of the pathogen that has been prepared by "classical methods", such as cell culture passage or chemical mutagenesis, or by targeted gene modifications with the help of recombinant-DNA techniques. Another form of live vaccines, are so called vector vaccines that consist of either or non-pathogenic microorganism or an attenuated pathogen that also contains antigen(s) of other pathogens. A live vaccine candidate will be characterized and tested for purity before the start of studies in animals. In vaccination-challenge studies using the infection model, it will be evaluated whether the vaccine candidate can provide the required protection against the pathogen in terms of reduction of infection, clinical signs and (histo)pathology. Only if a vaccine candidate gives promising results (i.e. (statistically significantly) reduces one or more aspects of a disease) it is considered for the development phase. By studying the immune response after vaccination, it will be attempted to find a correlation between the height of the immune response (e.g. as measured in in vitro virus-neutralization) and protection in the target animal (ruminant). In those instances where such a correlation can be established, candidate vaccines can be tested on the basis of that response instead of by challenge infection. However, although some vaccines are able to protect against the disease in question, the immune response measured (if any) is not always indicative of the level of protection, especially in case protective antigen(s) are unknown. If no correlate of protection is available, vaccine efficacy can only be evaluated in vaccination-challenge studies.

In order to make a proper risk-benefit analysis for a new product, all vaccines have to be tested in safety studies in the target animal (Ph.Eur 5.2.6 (Evaluation of safety of veterinary vaccines and immunosera), EU Directive 2009/9/EC amending Directive 2001/82/EC (Community code relating to veterinary medicinal products), VICH guidelines and national guidelines and regulations). Inactivated and subunit vaccines usually contain an adjuvant that enhances the immune response to the antigen(s) in the vaccine. Unfortunately, although the adjuvant preparations themselves can be considered safe, the combination of antigen and adjuvant sometimes results in unwanted systemic and/or local reactions after vaccination. Therefore, for each new inactivated or subunit vaccine the effect on the animals' general health, determined by observing clinical signs (e.g. general demeanour, body temperature, appetite etc.) and injection site reactions has to be determined. For an attenuated live vaccine, it has to be shown that it is unable to induce disease. Therefore, live vaccine candidates will be evaluated for their lack of virulence in the infection model. Testing specific gene-deleted mutants in the infection model will also provide knowledge on which antigens are required for pathology and/or survival within the host. These antigens can then be considered for an inactivated vaccine approach.

As evaluation of the safety and efficacy of vaccination will be combined in the research phase, studies will be performed according to the following basic set-up (infection will not be performed in case an



immunological marker for protection can be applied):

- Administration of the candidate vaccine
- Observation of clinical signs post vaccination
- Monitoring responses (e.g. blood sampling)/persistence (e.g. shedding) in case of a live vaccine
- Infection with a pathogen (field isolate)
- Observation of clinical signs post infection/sampling (e.g. for shedding of the pathogen)
- Necropsy to investigate (histo)pathological changes

The degree of discomfort encountered directly as a result of vaccination and sampling is small and such procedures are routinely used in normal veterinary care. The one area in which a moderate to severe degree of suffering may occur is after the onset of clinical disease following infection.

Ad 3) Assay development and preparation of biomaterials

To set-up assays that can help to detect a pathogen (e.g. by immunohistochemistry), to discriminate between different strains (e.g. serotyping) or develop immunological assays to quantify whole pathogens or specific antigens (antigenic mass and potency tests) it may be necessary to use laboratory animals for the preparation of sera or monoclonal antibodies if the required reagents are not available. For each new vaccine, batch tests for the quantification and identification of the active ingredients are required under EU Directive 2009/9/EC amending Directive 2001/82/EC (Community code relating to veterinary medicinal products) and Ph.Eur 0062 (Vaccines for veterinary use) to verify the consistency of the manufacturing process and the final product. Preferably, in vitro tests are used for batch testing, but in case an in vitro batch potency test is not possible for a new vaccine, a serological assay in laboratory animals will have to be set up. In addition, for some vaccines for which a Ph.Eur monograph exists, a mandatory batch potency test in laboratory animals is described.

In a few of cases, determination of the protection against challenge infection is mandatory or necessary for scientific or technical reasons.

Immunization experiments of laboratory animals will generally be as follows:

- Administration of antigen/pathogen
- Collection of blood

In case of potency tests that involve challenge infection, the following additional treatments are employed

- Administration of challenge inoculum
- Clinical observation

The degree of discomfort encountered directly as a result of vaccination and sampling is small and such procedures are routinely used in normal veterinary care. In the studies without challenge, discomfort will be mild or moderate depending on the number of injection/sampling moments.

Moderate to severe degree of suffering may only occur in studies with challenge infection.

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.

At the company, all R&D projects are subject to regular review by the R&D Governance Body. Only research projects with a reasonable market expectation will get approval to start the research phase. At the start of a research project, the project team agrees on the types of studies to be performed, the requirements for the studies and the sequence of these studies.

To test the feasibility of vaccine development against a (new) pathogen, the sequence of experiments is the following:

1. Infection studies.

The appearance of new strains of a particular pathogen is often difficult to observe, and can rely on anecdotal reports from veterinarians and animal owners. Field isolates might therefore have to be tested both in vitro and in vivo to determine if significant changes in pathogenicity have occurred. Studies are performed to investigate the pathogenicity of an agent and the immune response induced by the agent. If a potential pathogen fails to fulfil Koch's postulates, the vaccine research project will be stopped. The infection studies also serve to develop or improve an infection model. Once an infection model is available it can be used for fundamental studies and the next steps for vaccine development. These infection models should mimic the natural disease as much as possible. In case of [REDACTED] diseases, it might be necessary to [REDACTED] effect of [REDACTED] factors in order to reach the required [REDACTED] of the animals to the [REDACTED] with a [REDACTED]. As it is important to have the smallest possible variation in the level of infection/clinical signs between animals to be able to work with the lowest number of animals possible in the challenge experiments performed during the development phase, improvement/refinement of the challenge model (e.g. change

in the route of inoculation) may need to be undertaken. Also, when a new challenge inoculum is prepared, suitability for use in challenge studies has to be evaluated in the model.

On the other hand infection studies are required to determine whether a strain is sufficiently attenuated to serve as vaccine strain. On the basis of the study results, it will be determined if a live vaccine candidate has an acceptable risk-benefit profile. Some fine-tuning of the composition (e.g. changes in dose or application route) may be necessary before the optimal vaccine has been reached (proof of concept). In some cases it may not be possible to obtain proof of concept with the available candidates and knowledge of the pathogen, which means that the research project will be stopped.

## 2. Vaccination challenge studies

Orienting vaccination challenge studies are performed to get a first impression about the safety and efficacy of the vaccine candidates. It may take several rounds of experiments to test a number of vaccine candidates in order to find a candidate vaccine that has proven to be able to fulfil the required efficacy and safety criteria, the vaccine candidate can move to the development phase. If, with the knowledge available, it is impossible to produce a candidate vaccine that fulfils the criteria, further development is stopped.

## 3. Studies in laboratory animals for assay development and preparation of biomaterials.

These will only be undertaken if the necessary immunological reagents are not (commercially) available. A potency test in laboratory animals (according to Ph.Eur monographs) will only be developed in case a no suitable *in vitro* test is available.

All above mentioned studies are eventually done to obtain regulatory approval for ruminant vaccines. During the regular (1-2 times per year) project reviews by the R&D Governance Body the outcome of the studies is assessed against the requirements and pre-set milestones as well as go/no-go decision points are evaluated.

---

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	Infection studies in ruminants
2	Vaccination challenge studies in ruminants
3	Assay development and preparation of biomaterials
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Appendix Description animal procedures

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

### 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	22100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	[REDACTED]	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		1	Research: Infection studies in ruminants

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

### 2 Description of animal procedures

#### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Infection studies will be performed for one of the three different reasons:

- 1) To determine the pathogenicity of new pathogens (to prove Koch's postulates), variants of known pathogens, should they appear or the role of specific genes in the pathogenicity and interaction with the host's immune system.
- 2) To develop an infection model that will be used in vaccination-infection studies to assess the efficacy of vaccine candidates (see Addendum 2).
- 3) To assess the safety profile of a live attenuated vaccine candidate obtained by "classical" means (e.g. in vitro passage or chemical mutagenesis) or gene-modification (including vector vaccines).

In general, the application of a pathogen will be done via the natural route of infection, but if the natural route does not induce all presentations of a disease under laboratory conditions, it might be necessary to use another route (e.g. parenteral injection to induce a systemic infection).

Application of a potential vaccine candidate will typically be done by the route intended as application route of the future product, but in specific cases it might be necessary to follow the route that gives highest risk of adverse events in order to make a meaningful assessment of the safety profile.

In case a pathogen or vaccine candidate might cause transplacental infection, pregnant animals at one or more specified stage of pregnancy have to be used in the infection studies. The animals are then observed until the end of pregnancy to determine the outcome of the pregnancy and the health status of the offspring. Samples might have to be taken from the offspring to determine the presence of the pathogen / vaccine candidate or specific pre-colostral antibodies. Alternatively, [REDACTED]

After inoculation of the vaccine candidate or pathogen, one or more of the following parameters will be

evaluated:

- Clinical signs (e.g. changes in general health and or disease specific symptoms and local reactions)
- Body temperature (rectal temperature)
- Body weight
- Virus, bacterial or parasites shedding (swabbing of mucosal surfaces, sampling of faeces, urine, milk), viral/bacterial/parasitic load in [REDACTED] or other tissues ([REDACTED])
- Viraemia, bacteraemia or parasitemia or haematological parameters (blood/[REDACTED] sampling)
- Post mortem examination (macroscopical and microscopical)

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

Four or more of the following procedures will be undertaken depending on the characteristics of the vaccine/ pathogen involved; the types of pathogens are described under B (in italics the frequency of the procedures):

1. Daily observation / scoring clinical signs including measurement of rectal temperature [REDACTED]
2. Weighing ([REDACTED])
3. Blood sampling ([REDACTED]) to determine [REDACTED] parameters and / or to determine the presence of the pathogen or vaccine candidate in the blood
4. [REDACTED] treatment by application of [REDACTED] drugs ([REDACTED] / [REDACTED]) and / or inoculation of [REDACTED]
5. Administration of pathogen or vaccine candidate ([REDACTED])
6. Swabbing of (mucosal) surfaces [REDACTED] to determine the excretion of the pathogen or vaccine candidate
7. [REDACTED] to determine the presence of the pathogen or vaccine candidate in the [REDACTED]
8. [REDACTED] ( $1x - 4x$ ) to determine the presence of the pathogen or vaccine candidate in the [REDACTED]
9. Urine, fecal, colostrum / milk samples [REDACTED] to determine the presence of the pathogen or vaccine candidate
10. Punction of [REDACTED] or installation of a [REDACTED]
11. Punction [REDACTED]
12. [REDACTED] biopsy [REDACTED]
13. Pregnancy check [REDACTED]
14. Euthanasia

The duration of all procedures listed above will only be minutes at most. Typically, the length of the observation period after infection is [REDACTED]. If pregnant animals have to be followed until birth, the observation period will be longer, but in general, the total number of treatments does not increase. To rule out that clinical signs are caused by an unintended co-infection, non-infected control animals may be included in a study. In addition, in models for neonatal disease in sheep and goats, ewes/goats may be required to give birth to and foster the lambs / kids but these will not be infected.



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

In this type of initial studies, it is not obligatory to demonstrate statistically significant differences between treatment groups. However, these studies will enable an estimation of the variance between individual responses of the animals in a group at these particular observation points. Based on this information the minimum numbers of animals per group needed to demonstrate the efficacy of a vaccine during the development phase can be estimated. In this type of experiments, the group size is in general 5-8 animals, depending on the expected variation in the infection model. This group size is in line with the group size for infection studies as specified in most European Pharmacopoeia monographs on ruminant vaccines.

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

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

Studies will be performed in cattle, sheep and / or goats as appropriate. Animals of both sexes can be used for this type of animal experiment unless the study has to be performed in pregnant and / or lactating animals.

Purchase of animals: The animals will be purchased from commercial suppliers, obtained from affiliated farms or bred at [REDACTED] facilities.

If a certain microbial status is required, animals will be purchased from farms with the respective (certified) microbiological status and / or screened prior to inclusion in the study.

If the study design requires that animals are vaccinated and / or infected at [REDACTED] or when only a [REDACTED], the young animals have to be [REDACTED] accordingly from the farms of birth to the testing facility.

#### Special requirements

If young animals with a specific [REDACTED] status are required, it is often necessary to warrant that [REDACTED]. As these [REDACTED] animals are more susceptible for intercurrent infections, they receive [REDACTED] treatment. With the exception of studies against [REDACTED] pathogens, [REDACTED] can be given to the animals [REDACTED] onwards as an aid in the prevention of [REDACTED]

#### Age of animals:

Age of the animals for vaccine research varies from a few hours old to adult. The age of the animals to be used should be the age at which clinical disease is expected or the minimal age recommended for use of the vaccine.

If the infection has to be done in very young lambs or kids, it might be necessary to include the ewes / goats to foster the lambs / kids. In order to study transplacental spread of the pathogen or vaccine

candidate it may be necessary to include dams in one or more specific trimester of pregnancy. Samples might have to been taken from the offspring, for certain studies, euthanasia of the offspring might be required.

The tables below specify which models would be used for the different pathogens that might be included in infection studies during the research projects over the next 5 years. The lists are more extensive than the actual portfolio will be, but it is not possible at this moment to predict exactly which pathogens will be worked on.

The animal categories listed are the age groups considered to be most sensitive and therefore have to be used to perform the basic efficacy and safety studies.

Priorities within the R&D portfolio are based on market needs and the estimated likelihood of success of obtaining a vaccine candidate that fulfills the required product profile. Priorities can shift upon identification of new unmet needs in the field. For example, if a new [REDACTED] pathogen with substantial impact on the ruminant industry is discovered, this will be given priority over research into a second generation improved product for a [REDACTED] pathogen.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
New pathogen	Cattle <6 Months old	Severe (max 70%) <sup>1</sup>	Max 2 wk

<sup>1</sup>: Studies with potential new pathogens are given the highest expected discomfort score until the severity of clinical signs has been established

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
██████████	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 2 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 2 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Severe (max 50%)	Max ± 2 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
New pathogen	Cattle <6 Months old	Moderate (max 100%) <sup>2</sup>	Max 2 wk

<sup>1</sup>Vaccines are given to ██████████ cattle in order to ██████████. This part of the study does only cause mild discomfort. The information given in the table above relates to the discomfort during challenge studies ██████████ will be determined.

<sup>2</sup>: Studies with potential new pathogens are given the highest expected discomfort score until the severity of clinical signs has been established

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
██████████	Adult cows	Moderate (max 50%)	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Moderate (max 50%)	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Mild	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Mild	Max 2 wk
██████████	Adult ewes	Mild	Max 2 wk
██████████	Adult ewes	Mild	Max 2 wk
New pathogen	Adult cows	Moderate (max 100%) <sup>1</sup>	Max 2 wk
New pathogen	Adult ewes	Moderate (max 100%) <sup>1</sup>	Max 2 wk

<sup>1</sup>: Studies with potential new pathogens are given the highest expected discomfort score until the severity of clinical signs has been established

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
██████████	Adult cows	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Severe (max 50%)	Max 1 wk
██████████	Adult cows	Severe (max 50%)	Max 1 wk

██████████	Adult cows	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Severe (max 50%)	Max 1 wk
New pathogen	Adult cows	Severe (max 100%) <sup>1</sup>	Max 1 wk

<sup>1</sup>: Studies with potential new pathogens are given the highest expected discomfort score until the severity of clinical signs has been established

██████████  
██  
██

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
██████████	Adult cows	Moderate (max 70%)	Max 2 wk

██  
██  
██

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
██████████	Cattle <6 Months and adult cows	Moderate (max 50%)	Max 2 wk

██  
██

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
██████████	sheep <6 Months	Severe (max 40%)	Max 1-2 d
██████████	cattle <6 Months	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
██████████	sheep <6 Months	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Severe (max 70%)	Max 1-2 days
██████████	sheep <6 Months	Severe (max 50%)	Max 1 wk
██████████	cattle <6 Months	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	sheep <6 Months	Mild	Max 2 wk
██████████	cattle <6 Months	Mild	Max 2 wk
██████████	cattle <6 Months	Mild	Max 2 wk
██████████	cattle <6 Months	Mild	Max 2 wk
██████████	cattle <6 Months	Severe (max 50%)	Max 1-2 d
██████████	sheep < 6 Months	Severe (max 50%)	Max 1-2 d
██████████	cattle <6 Months	Mild	Max 2 wk
██████████	sheep < 6 Months	Mild	Max 2 wk
New pathogens and new types of models (██████████)	cattle <6 Months sheep < 6 Months	Severe (max 100%) <sup>2</sup>	Max 1 w

<sup>1</sup> Efficacy of ██████████ vaccines in ruminants is tested by ██████████ only

<sup>2</sup>: Studies with potential new pathogens are given the maximum discomfort score until the severity of clinical signs has been established

Based on the experience over the last 5 years and the current R&D program and priorities, the total expected number of cattle, sheep and goat per age group and discomfort category is the following:



Species	Discomfort score*	Animals <6 months	Adult**
Cattle	Mild***	■	■
	Moderate	■	■
	Severe	■	■
Sheep	Mild***	■	■
	Moderate	■	■
	Severe	■	■
Goat	Mild***	■	■
	Moderate	■	■
	Severe	■	■

\*: Discomfort due to disease

\*\*:

\*\*\*: Due to repeated procedures the overall discomfort will be moderate

In the infection studies, one or more groups are compared to an uninfected control group. The group size is dependent on the disease model. In general, the group size used will be 5-8 animals but could be larger depending on the expected variation in the infection model. The expected numbers per category of vaccine are:

Per Model	Cattle <6Months	Adult cattle	Sheep <6Months	Adult sheep	Goat <6Months	Adult goat
■	■	■	■	■	■	■
■	■	■	■	■	■	■
■	■	■	■	■	■	■
■	■	■	■	■	■	■
■	■	■	■	■	■	■
■	■	■	■	■	■	■
■	■	■	■	■	■	■
■	■	■	■	■	■	■
■	■	■	■	■	■	■

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

Re-use might be considered for animals that experience only minor discomfort during the first study, for example uninfected control animals. This approach is considered acceptable especially in case of animals that were raised under special conditions (e.g. ■■■■■) to achieve a certain ■■■■■ status

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

xNo

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.

---

**Replacement:**

In accordance with international regulations, animals of the target species must be used to demonstrate the safety and efficacy of a vaccine because there are no suitable alternatives or models for the induction of immunity in a whole organism or for the infection of living tissues as complex as those found in the whole animal in which the vaccines are intended to have efficacy. Therefore, during the research phase, infection models have to be developed in the target animals-and candidate vaccines have to be tested in the same models.

**Reduction:** All studies are performed with the lowest possible number of animals that are required to enable meaningful interpretation of the results. This will be achieved through an ongoing evaluation of the observations in each study. The number of animals per study will be substantiated in each study protocol. According to internal procedures, the study protocol will be reviewed by the Animal Welfare Body and a statistician.

**Refinement:**

Where possible it is pursued to refine the routes of administration of substances and sampling techniques to improve animal welfare/to reduce discomfort of administration, but without endangering the scientific outcome. Ruminants are the target species and there are no other less innervated/sentient species that could be a model for the ruminant diseases that are studied. See next paragraph for other refinement methods that are applied.

The classic method to prove protection of a new vaccine is efficacy in a vaccination-challenge test. However, if immunological correlates of protection (e.g. a serological response) can be used to prove efficacy this will be used rather than challenge infection. When an infection model has to be used, humane endpoints will be employed and staff will be fully trained to recognize animals that experience discomfort. Animals will be closely monitored and additional health checks are performed to ensure that no animal is left suffering.

---

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

---

For monitoring of the clinical health status of animals, all study animals will be checked at least once a day by a certified person. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

Furthermore efforts are made to optimally enrich the environment during containment.

---

## **Repetition and duplication**

**E. Repetition**

---

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

---

The vaccines in the companys R&D program are unique and proprietary to the company. To show that vaccines are compatible (combined or associated use), a number of safety and efficacy studies done with the individual products has to be repeated with the vaccines administered together according to international regulations and guidelines.

---

## **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

---

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

The animals are housed socially, but animals might have to be housed (temporarily) individually without physical contact (but in the same holding room) in order to [REDACTED]. Some studies may require limited bedding during containment. In a few cases, it is necessary to use no bedding because of scientific reasons.

#### **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, 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.

Injections (for application of challenge material, injection with [REDACTED] drugs or agents) as well as sampling of blood are part of normal farm practice/veterinary care and will induce only mild discomfort. If the sampling is repeated (>5), the discomfort is considered to be moderate as a result of the stress when restrained and during handling of the animal.

All biotechnical procedures such as vaccination and blood sampling procedures have been described in Standard Operating Procedures (SOPs) (GLP accredited procedures).

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

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

Measurement of body temperatures and body weight, sampling urine, faeces, colostrum/milk, sampling on different mucosae [REDACTED], as well as [REDACTED] are part of normal farm practice/veterinary care and will induce only mild discomfort. If the sampling is repeated ([REDACTED] for the [REDACTED] and [REDACTED] or [REDACTED] for the other procedures), the discomfort is considered to be moderate as a result of the stress during the fixation and handling of the animal.

All biotechnical procedures such as inoculation and sampling procedures have been described in Standard Operating Procedures (SOPs) and only well trained personnel will be responsible for the execution (GLP accredited procedures).

[REDACTED] deprived animals are more susceptible to disease and might therefore encounter discomfort related to intercurrent diseases. Transport of the animals to the testing facility might cause transient discomfort for the duration determination the protection against challenge infection of the transport, especially for animals that are transported [REDACTED]

The pathogenicity of the pathogen / safety profile of the vaccine candidate used in the infection studies is not yet determined. Therefore, it is possible that adverse events occur.

Depending on the nature of the pathogen / vaccine candidate the discomfort of the infection can range from mild in the absence of any clinical signs (e.g. [REDACTED]) to moderate (e.g.

██████████) and severe (e.g. ██████████).

In case an infection model has to be developed for pathogens that do not cause clinical disease or only very mild disease, it might be necessary to ██████████ the animals. These procedures and any effects related to the ██████████ treatment are already taken into consideration for the discomfort levels and durations listed above in the respective tables.

The clinical health status of all animals is checked at least once a day by qualified personnel. Special attention is paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

In consultation with the veterinarian and Study Director, if treatment does not interfere with the test results, it will be decided whether to apply adequate veterinary care including analgesia to alleviate treatment related pain (for example infection studies with ██████████ pathogens or ██████████ ██████████ or pain not related to the treatment. In case of severe suffering, humane endpoints are applicable. General humane endpoints are described in an SOP (e.g. the condition of the animal prevents it from eating and drinking regularly, severe loss of body weight) and test specific humane endpoints are given in each study protocol if applicable.

---

Explain why these effects may emerge.

These procedures may be part of the experimental design. For vaccines intended for use in young animals, the study design may require that animals are vaccinated and / or infected at the day of birth or when only ██████████. In these cases, the young animals have to be ██████████ accordingly from the farm of birth to the testing facility.

---

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

All biotechnical procedures will only be performed according to standard procedures described in SOPs (GLP accredited procedures).

The number of samplings is reduced to a minimum number required to for a valid evaluation of results.

---

### **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.

The severity of discomfort is depending on the nature of the pathogen (see 3.1 of the project proposal for specific clinical signs of the pathogens involved). However, the duration of severe discomfort will be limited due to the application of a humane endpoint if needed. Therefore, pathogen specific humane endpoints are formulated when discomfort is foreseen. These contain information about the clinical signs that can be expected and describe when a humane endpoint has been reached for (a combination of) the respective clinical signs. It also describes the scientific endpoint; the degree of progress of disease that is necessary to be able to draw conclusions about the effectiveness of the treatment tested. The humane endpoints are always leading. These test-specific humane endpoints are described in the corresponding study protocol. Each study protocol is reviewed by the AWB before execution of the study. In case it is difficult to reach a decision based on the pre-defined criteria for an endpoint the designated veterinarian is empowered to decide that a humane endpoint is applied/reached.

General humane endpoints (e.g. the condition of the animal prevents it from eating and drinking regularly, severe loss of body weight, pain) are described in an SOP. These endpoints are applicable to all animals, irrespectively of the type of experiment.

---

Indicate the likely incidence.

Considering the expected number of studies with the different pathogens, the expected number of animals included in the different treatment groups (i.e. infected vs control group) and the expected severity, at most 30 % of the animals is expected to have severe discomfort that would require euthanasia.

---

### **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').

---

For the infection studies the type and severity of the clinical signs are depending on the type of disease.

Similar to natural field infections they may cause mild to severe pain, distress, suffering or even impending death. See B for an overview of the different pathogens involved, the maximal discomfort caused by the disease and the maximum number of animals expected to reach the highest discomfort category.

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Postmortem investigation can be part of the experimental design to evaluate (histo)pathological lesions at different organ systems and or to attempt re-isolation of the inoculum from tissues and organs. In addition, animals with a pathogen cannot be returned to the farm of origin or transported to another farm to prevent the spread of disease. Therefore, all animals might have to be euthanized at the end of the study or when a humane endpoint is reached. Control animals that have not been infected may be reused or returned to the farm of origin or transported to another farm. Moreover, return of the animals to commercial farms or slaughter for human consumption is often prohibited by the current legislation on use of antibiotics.

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.

X Yes



## Appendix Description animal procedures

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

### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 22100

1.2 Provide the name of the licenced establishment. [REDACTED]

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
2	Research: Vaccination challenge studies in ruminants

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

### 2 Description of animal procedures

#### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

During the research stage of a vaccine project, studies are carried out to estimate, whether the candidate vaccine is likely to successfully pass the safety and efficacy studies that are later on performed in the development phase.

The aim of this type of vaccination studies is to test if a vaccine candidate i) has acceptable safety characteristics and ii) is efficacious i.e. induces a measurable immune response and / or protects against one or more aspects of the disease caused by the pathogen(s) involved. To this end, animals are vaccinated according to the anticipated schedule and observed for local and systemic reaction after vaccination. The immune response after vaccination is determined. In the absence of a correlate of protection, the vaccinated animals or in case the vaccine is intended for the induction of passive protection, animals fed colostrum from vaccinated mothers will be infected with a challenge strain according to the previously established infection model (see [REDACTED]). Unvaccinated animals will also be included in the experiment as control to determine the efficacy of the experimental vaccine. After vaccination and after challenge infection, one or more of the following parameters will be evaluated:

- Clinical signs (e.g. changes in general health and or disease specific symptoms and local reactions)
- Body temperature (rectal temperature)
- Body weight
- Virus, bacterial or parasites shedding (swabbing of mucosal surfaces, sampling of faeces, urine, milk), viral/bacterial/parasitic load in [REDACTED] or other tissues [REDACTED])
- Viraemia, bacteraemia or parasitemia or haematological parameters (blood/[REDACTED] sampling)
- Post mortem examination (macroscopical and microscopical)

On the basis of the study results, it will be determined if a vaccine candidate has an acceptable risk-benefit

profile that is in line with criteria that have been laid down in EU directives, the Pharmacopoeia Europaea (Ph.Eur) and guidelines and regulations of the European Medicines Agency and other international regulatory bodies when applicable. Some fine-tuning of the composition (e.g. changes in antigens/adjuvant included) may be necessary before the optimal vaccine has been reached (proof of concept). In some cases it may not be possible to obtain proof of concept with the available candidates and knowledge of the pathogen, which means that the research project will be stopped.

During these orientating vaccination studies, it will also be attempted to find a serological correlate with protection or another surrogate immunological marker that will enable the drawing of conclusions on the efficacy of a candidate vaccine without challenge in further studies.

In case of [REDACTED] diseases, it might be necessary to mimic the [REDACTED] effect of [REDACTED] factors in order to reach the required sensitivity of the animals to the challenge infection with a [REDACTED] pathogen.

In case a vaccine is intended for protection against transplacental infection, pregnant animals are challenged at one or more specified stage of pregnancy. The animals are then observed until the end of pregnancy to determine the outcome of the pregnancy and the health status of the offspring. Samples might have to be taken from the offspring to determine the presence of the challenge strain or specific pre-colostral antibodies. Alternatively, the vaccinated dams might have to be euthanized at pre-set times after the challenge infection in order to harvest the fetus and test fetal tissues and organs for the presence of the vaccine strain or specific antibodies.

---

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

Four or more of the following procedures will be undertaken depending on the characteristics of the vaccine/ pathogen involved; the types of pathogens are described under B (in italics the frequency of the procedures):

1. Daily observation / scoring clinical signs including measurement of rectal temperature [REDACTED]
2. Weighing [REDACTED]
3. Blood sampling [REDACTED] to determine [REDACTED] parameters and / or to determine the presence of the vaccine strain in the blood and / or to determine the presence of the challenge strain in the blood
4. Vaccine administration [REDACTED]  
/ [REDACTED]
5. Palpation of the injection site [REDACTED]
6. [REDACTED] by application of [REDACTED] drugs [REDACTED]  
[REDACTED]
7. Challenge administration [REDACTED]  
[REDACTED]
8. Swabbing of (mucosal) surfaces [REDACTED] *after vaccination*) to determine the excretion of the vaccine and / or [REDACTED] ) to determine the excretion of the challenge strain
9. [REDACTED] to determine the presence of the challenge strain in the [REDACTED]  
[REDACTED]
10. [REDACTED] to determine the presence of the challenge strain in the [REDACTED]
11. Urine, fecal, colostrum / milk samples [REDACTED] to determine the presence of the challenge strain
12. Punction of [REDACTED] or installation of a [REDACTED]
13. Punction [REDACTED]
14. [REDACTED] biopsy [REDACTED]
15. Pregnancy check [REDACTED]
16. Euthanasia

The duration of all procedures listed above will only be minutes at most. Typically, the length of the observation period after vaccination is 14 days after each vaccination. If pregnant animals have to be followed until birth, the observation period will be longer, but in general, the total number of treatments does not increase.

The interval between vaccination and challenge infection or end of the study (in case of surrogate marker for protection) will be chosen in such a way that optimal protection is to be expected. The length of the observation period after challenge infection depends on the incubation period of the pathogen, but is

---

generally 1 to 4 weeks. To rule out that clinical signs are caused by an unintended co-infection, non-infected control animals may be included in a study. In addition, in models for neonatal disease in sheep and goats, ewes/goats may be required to give birth to and foster the lambs / kids but these will not be infected.

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

For new untested vaccine candidates it needs to be proven that they fulfil the required efficacy and safety criteria. Therefore, in initial studies small numbers of animals will be used that may not be sufficient to demonstrate statistically significant differences between treatment groups. However, with such studies it will be possible to gain an estimate of the variance between individual responses of the animals in a group at these particular observation points. This information will enable calculations to identify the minimum numbers of animals needed in the groups to give sufficient likelihood of obtaining a statistically significant result by which it can be judged that the treatments have had a real effect. In particular, the variance in the groups together with the magnitude of effect will be used in power calculations to achieve 80% power at the 95% confidence level (regarded by regulatory authorities as the standard by which such experiments should be designed).

## **B. The animals**

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

Studies will be performed in cattle, sheep and / or goats as appropriate. Animals of both sexes can be used for this type of animal experiment unless the study has to be performed in pregnant and / or lactating animals.

Purchase of animals: The animals will be purchased from commercial suppliers, obtained from affiliated farms or bred at [REDACTED] facilities.

If a certain microbial status is required, animals will be purchased from farms with the respective (certified) microbiological status and / or screened prior to inclusion in the study.

If the study design requires that the animals are vaccinated and / or infected at the [REDACTED] or when only a [REDACTED], the young animals have to be [REDACTED] accordingly from the farm of birth to the testing facility.

### Special requirements

If young animals with a specific [REDACTED] status are required, it is often necessary to warrant that [REDACTED]. As these [REDACTED] animals are more susceptible for intercurrent infections, they [REDACTED] treatment. With the exception of studies against [REDACTED] pathogens, [REDACTED] can be given to the animals from [REDACTED] after birth onwards as an aid in the prevention of [REDACTED]

### Age of animals:

Age of the animals for vaccine research varies from a few hours old to adult. The age of the animals to



be used should be the minimal age recommended for use of the vaccine.

If very young lambs or kids have to be vaccinated, it might be necessary to include the ewes / goats to foster the lambs / kids. For vaccines intended to be used for pregnant / lactating animals, it may be necessary to include dams in one or more specific trimester of pregnancy, depending on the vaccination schedule to be recommended. Samples might have to be taken from the offspring, for certain studies, euthanasia of the offspring might be required.

The tables below, specify, which models would be used for the different pathogens that might be included in research projects over the next 5 years. The lists are more extensive than the actual portfolio will be, but it is not possible at this moment to predict, which pathogens will be worked on.

The animal categories listed are the age groups considered to be most sensitive and therefore have to be used to perform the basic efficacy studies.

Priorities within the R&D portfolio are based on market needs and the estimated likelihood of success of obtaining a vaccine candidate that fulfills the required product profile. Priorities can shift upon identification of new unmet needs in the field. For example, if a new [REDACTED] pathogen with substantial impact on the ruminant industry is discovered, this will be given priority over research into a second generation improved product for a [REDACTED] pathogen.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
New pathogen	Cattle <6 Months old	Severe (max 70%) <sup>1</sup>	Max 2 wk

<sup>1</sup>: Studies with potential new pathogens are given the highest expected discomfort score until the severity of clinical signs has been established

[REDACTED]

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 2 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 2 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED] <sup>1</sup>	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 50%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
New pathogen	Cattle <6 Months old	Moderate (max 100%) <sup>2</sup>	Max 2 wk

<sup>1</sup>Vaccines are given to [REDACTED] in order to [REDACTED]. This part of the study does only cause mild discomfort. The information given in the table above relates to the discomfort during challenge studies in [REDACTED] will be determined.

<sup>2</sup>: Studies with potential new pathogens are given the highest expected discomfort score until the severity of clinical signs has been established

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
[REDACTED]	Adult cows	Moderate (max 50%)	Max 2 wk
[REDACTED]	Adult cows	Moderate (max 50%)	Max 2 wk
[REDACTED]	Adult cows	Mild	Max 2 wk
[REDACTED]	Adult cows	Mild	Max 2 wk
[REDACTED]	Adult ewes	Mild	Max 2 wk
[REDACTED]	Adult ewes	Mild	Max 2 wk
New pathogen	Adult cows	Moderate (max 100%) <sup>1</sup>	Max 2 wk
New pathogen	Adult ewes	Moderate (max 100%) <sup>1</sup>	Max 2 wk

<sup>1</sup>: Studies with potential new pathogens are given the highest expected discomfort score until the severity of clinical signs has been established

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
[REDACTED]	Adult cows	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
[REDACTED]	Adult cows	Severe (max 50%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Adult cows	Severe (max 50%)	Max 1 wk

██████████	Adult cows	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Severe (max 50%)	Max 1 wk
New pathogen	Adult cows	Severe (max 100%) <sup>1</sup>	Max 2 wk

<sup>1</sup>: Studies with potential new pathogens are given the highest expected discomfort score until the severity of clinical signs has been established

██████████  
██  
██

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
██████████	Adult cows	Moderate (max 70%)	Max 2 wk

██  
██  
██

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
██████████	Cattle < 6 Months and adult cows	Moderate (max 50%)	Max 2 wk

██  
██  
██

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
██████████	sheep < 6 Months	Severe (max 40%)	Max 1-2 d
	cattle < 6 Months	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
██████████	sheep < 6 Months	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Severe (max 70%)	Max 1-2 days
██████████	sheep < 6 Months	Severe (max 50%)	Max 1 wk
██████████	cattle < 6 Months	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	sheep < 6 Months	Mild	Max 2 wk
	cattle < 6 Months	Mild	Max 2 wk
██████████	cattle < 6 Months	Mild	Max 2 wk
██████████	cattle < 6 Months	Mild	Max 2 wk
██████████	cattle < 6 Months	Severe (max 50%)	Max 1-2 d
██████████	sheep < 6 Months	Severe (max 50%)	Max 1-2 d
██████████	cattle < 6 Months	Mild	Max 2 wk
	sheep < 6 Months	Mild	Max 2 wk
New pathogens and new types of models (██████████)	cattle < 6 Months sheep < 6 Months	Severe (max 100%) <sup>2</sup>	Max 1 w

<sup>1</sup> Efficacy of ██████████ vaccines in ruminants is tested by ██████████ only

<sup>2</sup>: Studies with potential new pathogens are given the maximum discomfort score until the severity of clinical signs has been established

Based on the experience over the last 5 years and the current R&D program and priorities, the total expected number of cattle, sheep and goat per age group and discomfort category is the following:

Species	Discomfort score*	Animals <6 Months	Adult**
Cattle	Mild***	■	■
	Moderate	■	■
	Severe	■	■
Sheep	Mild***	■	■
	Moderate	■	■
	Severe	■	■
Goat	Mild***	■	■
	Moderate	■	■
	Severe	■	■

\*: Discomfort due to disease

\*\* : Including [redacted]

\*\*\*: Due to repeated procedures the overall discomfort will be moderate

In the vaccination studies, one or more vaccinated groups are compared to an unvaccinated control group. The group size is dependent on the challenge model and the age of the animal at the time of challenge, as for some pathogens the susceptibility for infection/disease will diminish with age, making the use of relatively large group sizes necessary to be able to show a statistically significant difference. In general, the group size used will be 5-8 animals, but could be larger depending on the expected variation in the infection model.

The expected numbers per category of vaccine are:

Per Model	Cattle <6Months	Adult cattle	Sheep <6Months	Adult sheep	Goat <6Months	Adult goat
[redacted]	■	■	■	■	■	■
[redacted]	■	■	■	■	■	■
[redacted]	■	■	■	■	■	■
[redacted]	■	■	■	■	■	■
[redacted]	■	■	■	■	■	■
[redacted]	■	■	■	■	■	■
[redacted]	■	■	■	■	■	■
[redacted]	■	■	■	■	■	■
[redacted]	■	■	■	■	■	■

For the vaccines that are currently in the research phase, challenge will still have to be performed in [redacted] of the models to prove efficacy because of the absence of an immunological correlate of protection.

**C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

Re-use might be considered for animals that experience only minor discomfort during the first study, for example uninfected control animals. This approach is considered acceptable especially in case of animals that were raised under special conditions (e.g. [redacted]) to achieve a certain [redacted] status.

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

xNo

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.

Replacement:

In accordance with international regulations, animals of the target species must be used to demonstrate the safety and efficacy of a vaccine because there are no suitable alternatives or models for the induction of immunity in a whole organism or for the infection of living tissues as complex as those found in the whole animal in which the vaccines are intended to have efficacy. Therefore, during the research phase, candidate vaccines have to be tested in the same models.

Reduction: All studies are performed with the lowest possible number of animals that are required to enable meaningful interpretation of the results. This will be achieved through an ongoing evaluation of the observations in each study. The number of animals per study will be substantiated in each study protocol. According to internal procedures, the study protocol will be reviewed by the Animal Welfare Body and a statistician.

Refinement:

Where possible it is pursued to refine the routes of administration of substances and sampling techniques to improve animal welfare/to reduce discomfort of administration, but without endangering the scientific outcome. Ruminants are the target species and there are no other less innervated/sentient species that could be a model for the ruminant diseases that are studied. See next paragraph for other refinement methods that are applied.

The classic method to prove protection of a new vaccine is efficacy in a vaccination-challenge test. However, if immunological correlates of protection (e.g. a serological response) can be used to prove efficacy this will be used rather than challenge infection. When an infection model has to be used, humane endpoints will be employed and staff will be fully trained to recognize animals that experience discomfort. Animals will be closely monitored and additional health checks are performed to ensure that no animal is left suffering.

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

For monitoring of the clinical health status of animals, all study animals will be checked at least once a day by a certified person. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

Furthermore efforts are made to optimally enrich the environment during containment.

### **Repetition and duplication**

#### **E. Repetition**

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

The vaccines in the companys R&D program are unique and proprietary to the company. To show that vaccines are compatible (combined or associated use), a number of the safety and efficacy studies done with the individual products has to be repeated with the vaccines administered together according to international regulations and guidelines.

### **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

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

The animals are housed socially, but animals might have to be housed (temporarily) individually without physical contact (but in the same holding room) in order to [REDACTED]. Some studies may require limited bedding during containment. In a few cases, it is necessary to use no bedding because of scientific reasons.

#### **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, 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.

Vaccination, injections (for application of challenge material, injection with [REDACTED] drugs or agents) as well as sampling of blood-are part of normal farm practice/veterinary care and will induce only mild discomfort. If the sampling is repeated ([REDACTED]), the discomfort is considered to be moderate as a result of the stress when restrained and during handling of the animal.

All biotechnical procedures such as vaccination and blood sampling procedures have been described in Standard Operating Procedures (SOPs) and only well trained personnel will be responsible for the execution (GLP accredited procedures).

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

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

Measurement of body temperatures and body weight, sampling urine, faeces, colostrum/milk, sampling on different mucosae ([REDACTED]), as well as [REDACTED] are part of normal farm practice/veterinary care and will induce only mild discomfort. If the sampling is repeated ([REDACTED] for the [REDACTED] and [REDACTED], [REDACTED] or [REDACTED] for the other procedures), the discomfort is considered to be moderate as a result of the stress during the fixation and handling of the animal.

All biotechnical procedures such as vaccination and sampling procedures have been described in Standard Operating Procedures (SOPs) and only well trained personnel will be responsible for the execution (GLP accredited procedures).

[REDACTED] animals are more susceptible to disease and might therefore encounter discomfort related to intercurrent diseases. Transport of the animals to the testing facility might cause transient discomfort for the duration of the transport, especially for animals that are transported [REDACTED].

Vaccination can cause a transient increase in rectal temperature, sometimes accompanied with a reduced

level of activity, and a transient vaccination site reaction. Systemic reactions generally disappear within 24 hours, but local reactions (that are generally painless) can persist for several days and even weeks. The safety and efficacy profile of the vaccine compositions used in the research phase is not yet determined. Therefore, it is possible that adverse events occur or that protection of the vaccinated animals is very limited.

Depending on the nature of the challenge inoculum the discomfort of the challenge can range from mild in the absence of any clinical signs (e.g. [REDACTED]) to moderate (e.g. [REDACTED]) and severe (e.g. [REDACTED]). Vaccination will result in a significant reduction of clinical abnormalities after challenge compared to the unvaccinated control group and thus to a reduction of animals with discomfort.

In case of challenge studies with pathogens that do not cause clinical disease or only very mild disease, it might be necessary to [REDACTED] the animals. These procedures and any effects related to the [REDACTED] treatment are already taken into consideration for the discomfort levels and durations listed above in the respective tables.

The clinical health status of all animals is checked at least once a day by qualified personnel. Special attention is paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

In consultation with the veterinarian and Study Director, if treatment does not interfere with the test results, it will be decided whether to apply adequate veterinary care including analgesia to alleviate treatment related pain (for example infection studies with [REDACTED] pathogens or [REDACTED] or pain not related to the treatment. In case of severe suffering, humane endpoints are applicable. General humane endpoints are described in an SOP (e.g. the condition of the animal prevents it from eating and drinking regularly, severe loss of body weight) and test specific humane endpoints are given in each study protocol if applicable.

---

Explain why these effects may emerge.

These procedures may be part of the experimental design. For vaccines intended for use in young animals, the study design may require that the animals are vaccinated and / or infected at [REDACTED] or when only [REDACTED]. In these cases, the young animals have to be [REDACTED] accordingly from the farm of birth to the testing facility.

---

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

All biotechnical procedures will only be performed according to standard procedures described in SOPs (GLP accredited procedures).

The number of samplings will be done in accordance with the respective guidelines or if no requirements are given, the number of samplings is reduced to a minimum number required to for a valid evaluation of results.

---

## **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.

To determine the efficacy of a vaccine it is necessary to challenge animals with the pathogenic organism. The severity of discomfort is depending on the nature of the pathogen (see 3.1 of the project proposal for specific clinical signs of the pathogens involved). However, the duration of severe discomfort will be limited due to the application of a humane endpoint if needed. Therefore, pathogen specific humane endpoints are formulated when discomfort is foreseen. These contain information about the clinical signs that can be expected and describe when a humane endpoint has been reached for (a combination of) the respective clinical signs. It also describes the scientific endpoint; the degree of progress of disease that is necessary to be able to draw conclusions about the effectiveness of the treatment tested. The humane endpoints are always leading. These test-specific humane endpoints need to be described in the corresponding study protocol. Each study protocol is reviewed by the AWB before execution of the study. In case it is difficult to reach a decision based on the pre-defined criteria for an endpoint the designated veterinarian is empowered to decide that a humane endpoint is applied/reached.

General humane endpoints (e.g. the condition of the animal prevents it from eating and drinking regularly, severe loss of body weight, pain) are described in an SOP. These endpoints are applicable to

all animals, irrespectively of the type of experiment.

Indicate the likely incidence.

Considering the expected number of studies with the different pathogens, the expected number of animals included in the different treatment groups (i.e. vaccinated / infected / control group) and the expected severity, at most 20 % of the animals is expected to have severe discomfort that would require euthanasia.

#### **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').

For studies without challenge, discomfort will be mild to moderate depending on the number of sampling points. For vaccination-challenge studies, the type and severity of the clinical signs are depending on the type of challenge infection. Similar to natural field infections they may cause mild to severe pain, distress, suffering or even impending death. See B for an overview of the different pathogens involved, the maximal discomfort caused by the disease and the maximum number of animals expected to reach the highest discomfort category. Vaccination is expected to reduce the level of discomfort after challenge, but the non-vaccinated control group will experience the symptoms of the natural infection.

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Postmortem investigation can be part of the experimental design to evaluate (histo)pathological lesions at the injection sites and or to evaluate effect of the infection on different organ systems and or to attempt re-isolation of the inoculum from tissues and organs.

In addition, animals vaccinated with a non-licensed vaccine or infected with a pathogen cannot be returned to the farm of origin or transported to another farm to prevent the spread of disease.

Therefore, all animals might have to be euthanized at the end of the study or when a humane endpoint is reached. Control animals that have not been vaccinated and infected may be reused or returned to the farm of origin or transported to another farm. In case of a surrogate immunological marker (no challenge), animals housed on contract farms can remain on the farm or transported to other farms until the end of their natural/economic life.

Moreover, return of the animals to commercial farms or slaughter for human consumption is often prohibited by the current legislation on use of antibiotics.

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

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

Yes





## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure                                    |
|---------------|---|
| 3             | Research: Assay development and preparation of biomaterials |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The potency of each inactivated vaccine batch used in development studies has to be determined to set the limits for release and to determine the stability. Traditionally, the potency of inactivated vaccines, is measured in a so-called *in vivo* potency in . During the research phase of a vaccine project, the test protocol for the potency test is determined. In an initial study, the strength of the immune response is compared between the different animal species. In further studies, it is investigated, whether the antibody response is dose dependent and the release criteria are determined.

Apart from the replacement of experimental animals, *in vitro* potency tests are very much preferred over *in vivo* testing for multiple other reasons including costs and timelines. However, for several inactivated vaccines, *in vivo* potency tests are still necessary because it is either not possible to determine the antigen and/or adjuvant content *in vitro* or an *in vivo* batch test is mandatory under the respective legislation (e.g. Ph.Eur monograph.).

In such a batch potency test, animals are injected with one or more doses of the vaccine batch. The potency is preferably determined by measuring the antibody response. In a few cases, determination the protection against challenge infection is mandatory or necessary for scientific / technical reasons. Biomaterials such as specific antisera or monoclonal antibodies are needed in most vaccine projects for different purposes such as the identification, characterisation and quantification of the vaccine strain, neutralizing the vaccine virus, setting up *in vitro* tests et cetera.

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

Two or more of the following treatments will be employed in order to fulfil the requirements for the potency studies as laid down in the Ph Eur (*in italics the frequency of the treatments*). The same

treatments are also applied for the preparation of biomaterials:

1. Blood sampling [REDACTED] to determine [REDACTED] parameters

2. Test substance administration [REDACTED]

3. Weighing [REDACTED]

4. Euthanasia

The duration of these procedures will only be minutes.

In case of potency tests that involve challenge infection, the following additional treatments are employed

5. Administration of challenge material [REDACTED]

6. Clinical observation [REDACTED]

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

The group sizes for potency tests that are specified in guidelines typically range between 5 and 10. For those models that are not described in specific regulations, a group size of 5-10 animals is generally accepted by regulatory authorities. If sufficient knowledge on the variation is available the group size will be calculated such that a statistically significant difference between standard and substandard vaccine batches can be made with 80% power and 95% confidence.

For the preparation of antisera the minimal number of animals that will provide the required volume will be used.

For the preparation of [REDACTED] mice will be used per antigen.

## **B. The animals**

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

For some vaccines, the species to be used for a batch potency test is prescribed in a Ph.Eur monograph. In general, [REDACTED] are preferred over the ruminant target species because they are more genetically homogeneous and better microbiologically controlled.

Therefore, less variance in response and better reproducibility can be achieved, which means that the number of experimental animals can be lower than when using ruminants.

For some vaccines, the type of laboratory animals to be used for a batch potency test is prescribed in a Ph.Eur monograph.

Preparation of antisera in non-ruminant animals or murine monoclonal antibodies has the advantage, that these animals are free of antibodies against other ruminant pathogens.

Based on the experience over the last 5 years and the current R&D program and priorities, the total expected number of laboratory animals is the following:

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] of both sexes will be used, but for [REDACTED] [REDACTED] and [REDACTED] only females will be included in studies because of a higher risk of fighting in male animals and the relatively long time that the animals are in an experiment. With regard to the length of these experiments [REDACTED] it is not acceptable to use males, because they would need to be single housed.

Welfare concerns are the basis for the preferred use of female rabbits, mice and guinea pigs because they hardly fight. Data from recently executed experiments with male animals have shown that in half of the experiments there was a loss of animals because of severe fighting. This has resulted in the repetition of these experiments and therefore in the use of more animals. A loss of animals due to fighting has never occurred when female animals were used. We consider the aggression and fighting a worrying impairment of welfare. Moreover, the aggression will cause stress, which is known to have effects on the immune system.

In these studies the functioning of the immune system is crucial and variation in the immune response caused by external factors should be avoided as much as possible.

Origin [REDACTED]:

All animals are supplied by certified vendors accompanied by a health certificate according to FELASA recommendations. All purchased animals have a SPF status.

Origin [REDACTED]

Own SPF [REDACTED] breeding unit or commercial vendor.

Age of animals:

The required species and age (or weight) is usually designated as the most sensitive species or age for the test component in question. If such specific knowledge is not available the most practical choices are made, based on possibilities for purchase and housing conditions. Moreover, animals must be immunologically fit to be subjected to immunizations and blood samplings.

---

### 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.

Replacement:

Apart from the replacement of experimental animals, *in vitro* potency tests are very much preferred over *in vivo* testing for multiple other reasons including costs and timelines. Therefore, multidisciplinary teams are active at the company to replace *in vivo* potency tests by *in vitro* tests such as antigenic mass assays for the potency testing of vaccines.

Reduction: The animal species that is expected to give the most discriminatory test with the smallest number of animals will be used. The number of animals per study will be substantiated in each study protocol. Each study protocol will be reviewed by the Animal Welfare Body and a statistician.

Refinement: Following the codes of practice for immunization is the basis for refinement in these animal procedures. Where possible it is pursued to refine the routes of administration of substances and sampling techniques to improve, but without endangering the scientific outcome. For example; blood sampling in rodents is done under anesthesia. See next paragraph for other refinement methods that are applied.

Where ever possible, potency testing will be based on the testing of antibodies or other correlates of protection rather than by challenge.

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

Following the code of practice for immunization and the code of practice for monitoring the welfare of the animals is the basis for refinement in these animal procedures.

In general animals are always housed socially, but animals might have to be (temporarily) separated due to fighting or because of veterinary concerns. Furthermore, to enhance animal welfare, species specific environmental enrichment is provided to all animals.

For monitoring of the clinical health status of animals, all study animals will be checked at least once a

day by a certified person. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

## 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.

A potency test model needs to be developed for a specific vaccine. Experiences from vaccines with similar composition can be used, but eventually, the model has to be validated for the specific vaccine. Specific biomaterials have to be available for each project. Prior to the preparation of new biomaterials, the scientific literature and the company database for biomaterials available at the different research sites will be consulted in order to prevent unnecessary preparation of new biomaterials.

## 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

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

Some studies may require limited bedding during containment.

### 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, analgesia or other pain relieving methods be used?

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

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

Injections (vaccination, inoculation of challenge material) and blood sampling are part of normal veterinary care / commonly used biotechnical procedures and will induce only mild discomfort or moderate discomfort of very short duration.

Anesthesia will be applied during blood sampling of [REDACTED]. Anesthesia will not be applied during sampling blood from [REDACTED]. In these species blood sampling causes only mild discomfort or moderate discomfort of very short duration. Applying anesthesia would only increase

discomfort as the animal needs to be restrained during administration.

For each species blood sampling and other biotechnical procedures have been described in Standard Operating Procedures (SOPs) (GLP accredited procedures).

As the vaccines to be tested have already been found to be safe in the target species (ruminants) it is very unlikely that they will cause adverse effects in non-target animals.

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

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

In general, biotechnological procedures such as weighing and sampling may result in discomfort, because animals need to be fixated and especially if performed repeatedly.

Moreover, application of the vaccine can result in a transient increase in rectal temperature, sometimes accompanied with a reduced level of activity, and a transient vaccination site reaction. Systemic reactions will generally disappear within 24 hours, but local reactions (swelling redness), that are generally painless, can persist for several days and even weeks, but these local reactions do not affect normal behaviour (activity, feeding and drinking).

Depending on the nature of the challenge inoculum, the discomfort of the challenge can range from mild in the absence of any clinical signs (e.g. [REDACTED]) to moderate (e.g. [REDACTED]) and severe (e.g. [REDACTED]). Vaccination will result in a significant reduction of clinical abnormalities after challenge compared to the unvaccinated control group.

For monitoring of the clinical health status of animals, all study animals will be checked at least once a day by a certified person. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

In case animals experience discomfort (whether or not related to the treatment), it will be decided in consultation with the veterinarian and Study Director whether to apply adequate veterinary care to alleviate unexpected pain and/or distress (if treatment does not interfere with the test results). In case of severe suffering, humane endpoints are applicable. General humane endpoints are described in an SOP (e.g. the condition of the animal prevents it from eating and drinking regularly, severe loss of body weight) and test specific humane endpoints are given in each study protocol if applicable.

Explain why these effects may emerge.

These procedures and if applicable the clinical signs caused by the challenge may be part of the experimental design.

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

Weighing is part of normal veterinary care and will induce only mild discomfort. Taking samples of mucosal surfaces or urine will result in mild discomfort, with the exception of repeated mucosal swabbing, which is considered to be moderate discomfort. Biotechnical procedures have been described in SOPs (GLP accredited procedures). Unless required by the applicable regulations or scientific reasons, potency testing will be based on the testing of correlates of protection such as antibody levels rather than by challenge.

### **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 potency tests that require challenge with a pathogenic organism, the severity of discomfort is depending on the nature of the pathogen. However, the duration of severe discomfort will be limited due to the application of a humane endpoint if needed. Therefore, pathogen specific humane endpoints are formulated when discomfort is foreseen. These contain information about the clinical signs that can be expected and describe when a humane endpoint has been reached for (a combination of) the respective clinical signs. It also describes the scientific endpoint; the degree of progress of disease that is necessary to be able to draw conclusions about the effectiveness of the treatment tested. The humane endpoints are always leading. These test-specific humane endpoints need to be described in the corresponding study protocol. Each study protocol is reviewed by the AWB before execution of the study. In case it is difficult to reach a decision based on the pre-defined criteria for an endpoint the designated

veterinarian is empowered to decide that a humane endpoint is applied/reached.  
General humane endpoints (e.g. the condition of the animal prevents it from eating and drinking regularly, severe loss of body weight, pain) are described in an SOP. These endpoints are applicable to all animals, irrespectively of the type of experiment.

Indicate the likely incidence.

As the overall majority of potency tests as well as the preparation of biomaterials do not require challenge, the incidence of severe discomfort requiring euthanasia is estimated to be less than 2 %.

#### **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').

Discomfort will be mild to moderate depending on the number of sampling points for those models that do not require challenge as well as the preparation of biomaterials.

Depending on the challenge organism, discomfort might be severe in a minority of models.

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

For some potency models it is necessary to investigate the presence of (histo)pathological lesions and take organ and tissue samples for re-isolation of the vaccine strain.

For the preparation of antisera it is necessary to kill the animals in order to obtain the required volumes.

For preparation of monoclonal antibodies mice are killed to collect the lymphoid organs that are needed

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.

X Yes

# Format DEC-advies

---

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

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

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer
2. Titel van het project: **Research of new ruminant vaccines**
3. Titel van de NTS: **Onderzoek naar nieuwe vaccins tegen ziektes bij herkauwers**
4. Type aanvraag: **nieuwe aanvraag projectvergunning**
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC [REDACTED]
  - telefoonnummer contactpersoon [REDACTED]
  - e-mailadres contactpersoon [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC 3 april 2017
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken 13 april 2017
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van / tot
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag
  - advies aan CCD
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD. **Ja**

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

8. Eventueel horen van aanvrager **N.v.t.**
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Gestelde vraag / vragen
  - Verstrekt(e) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
  
  - Correspondentie met de aanvrager
  - Datum 13 april 2017

- Gestelde vraag/vragen zie onder
- Datum antwoord 14 april 2017
- Verstrek(e) antwoord(en) zie onder

## Vragen vanuit de DEC over het projectvoorstel "Research of new ruminant vaccines"

( in rood de reactie van de aanvrager)

### Non-technical summary

- Is het mogelijk om in 3.1 toe te voegen dat vaccinaties er ook voor zijn om de risico's van het uitbreken van zoonoses te beperken en antibiotica resistentie te voorkomen? Ja, zal worden toegevoegd, echter worden beide punten ook al 3.2 benoemd.
- Onder 3.5 graag meer verduidelijking van de genoemde percentages van ongerief. Ter verduidelijking is de tabel waarin de percentages enkel op basis van de door de ziekte veroorzaakte ongerief bepaald is, is verwijderd. Enkel de tabel waarin ook met de door de handelingen veroorzaakte ongerief rekening gehouden werd zal worden weergegeven.

### Appendix 1 (sommige punten gelden ook voor andere Appendices)

- Graag opheldering gebruik [redacted] dieren die geëuthanaseerd worden om de [redacted] te verkrijgen. Zijn de [redacted] meegeteld in het totale [redacted] Over het algemeen zullen alleen dieren gedurende [redacted] worden geëuthanaseerd. Indien euthanasie [redacted] nodig is zullen [redacted] worden meegeteld in het totale [redacted]
- Op pagina 5: kan de voetnoot bij de tabel [redacted] "aangepast worden? Lijkt nu ook op mild te slaan en niet alleen op new pathogens? Wordt aangepast.
- Op pagina 7, in de tabel boven sectie C: Wat wordt er precies bedoeld met [redacted] ? Voor deze studies zijn de modellen [redacted] van toepassing. De naam van de tabel zal worden gewijzigd naar [redacted]
- Gebruik analgesie (pagina 9); kan er een motivatie worden gegeven? Zijn er voorbeelden beschikbaar? De tekst zal worden aangepast: In consultation with the veterinarian and Study Director, if treatment does not interfere with the test results, it will be decided whether to apply adequate veterinary care including analgesia to alleviate treatment related pain [redacted] or pain not related to the treatment."
- Op pagina 9: er wordt over [redacted] en [redacted] samples gesproken maar die zijn nog niet eerder in de tekst genoemd Zullen worden toegevoegd aan de lijst met procedures in sectie A.
- Op pagina 10 onder J: Kan er inzage gegeven worden hoe de incidence of discomfort op 30% geschat is? Bij de schatting is rekening gehouden met het verwachte aantal studies met een bepaald pathoogeen, het verwachte aantal dieren dat niet gevaccineerd, maar wel besmet zou worden en het te verwachten ongerief. Deze overwegingen zullen als volgt worden weergegeven in de betreffende [redacted] Considering the expected number of studies with the different pathogens, the expected number of animals included in the different treatment groups (i.e. treated vs control group) and the expected severity, at most XX % of the animals is expected to have severe discomfort that would require euthanasia.
- Op pagina 11 onder L: wordt er naast inspectie van de injection site ook niet naar andere organen gekeken om een beeld van het infectieproces te krijgen? Uiteraard. De tekst zal worden aangepast om dit te verduidelijken.

### Appendix 2



- Op pagina 4: Kan er een verklaring gegeven worden voor de genoemde ratio? **Bedoelt wordt dat van de projecten betrekking hebben op vaccins en in van de projecten vaccins worden. Echter is de ratio niet direkt te projecteren op het aantal studies of het aantal dieren. Daarom lijkt het bij nader inzien beter, de alinea geheel te verwijderen.**
- Op pagina 6: wat wordt er precies met de bedoeld in de tabel? **Naar aanleiding van de vraag van de DEC zijn we tot de conclusie gekomen, dat dit onderzoek niet direct binnen de doelstelling "verbetering van gezondheid bij dier / mens" valt. Er zijn op dit moment geen concrete plannen voor dit onderzoek. Daarom zullen verwijzingen naar dit onderzoek uit de tabel en het project voorstel verwijderd worden.**
- Op pagina 9: onder I is het nodig om analgesie te noemen en voorbeelden (zie appendix 1) **Tekst zal worden aangepast zoals voor appendix 1.**
- Op pagina 10 onder J: Kan er inzage gegeven worden hoe de "incidence of discomfort" op 20% geschat is? **Zie appendix 1.**

### Appendix 3

- Op pagina 4 onder F: worden ook en individueel gehuisvest? **Nee. De betreffende zin zal worden verwijderd.**
- Op pagina 6 onder L: is het voor de ontwikkeling van beter om van organen te spreken i.p.v. alleen de **Tekst zal worden aangepast om ook het ontnemen van andere organen mogelijk te maken.**

- De antwoorden hebben **wel** geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

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

## B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? **Ja**
2. De aanvraag betreft een **nieuwe aanvraag**.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja**
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. **Er zijn geen DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies**

## C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*). **Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling: "Research of new ruminant vaccines". Het project heeft betrekking op dierstudies met nieuwe en verbeterde vaccins in de "research fase". In de "research fase" worden**

**nieuwe ziekteverwekkers geïdentificeerd, wordt de kennis van bekende ziekteverwekkers uitgebreid en wordt onderzoek gedaan naar de verbetering van bestaande vaccins, bijvoorbeeld door meerder vaccins te combineren in één product of door nieuwe formuleringen voor bestaande vaccins te ontwerpen. Deze fase gaat vooraf aan de "development fase", waarin de wettelijk verplichte experimenten worden gedaan die nodig zijn om het registratiedossier op te bouwen. In de "research fase" wordt al geanticipeerd op de "development fase" door bij de experimenten veel aandacht te schenken aan de vraag of de te ontwikkelen vaccins in een latere fase zullen kunnen voldoen aan de wettelijke eisen.**

**Ongeacht de vraag om welke ziekteverwekker het gaat wordt in deze fase een min of meer vaste strategie gevolgd die achtereenvolgens bestaat uit infectiestudies (is het geïsoleerde micro-organisme of producten daarvan de veroorzaker van de aandoening?), het opzetten van een infectiemodel, het ontwerpen en vervolmaken van een vaccinformulering (o.a. met behulp van immunogeniteitsstudies en met het infectiemodel) en het uitvoeren van oriënterende veiligheids- en werkzaamheidsstudies met een kandidaatvaccin. Waar mogelijk en nodig worden experimenten uitgevoerd volgens de richtlijnen van de regelgevende autoriteiten (o.a. de EP). Ook de infectiemodellen die in deze fase worden opgezet, en die zullen worden gebruikt voor de wettelijk verplichte werkzaamheidsstudies, dienen te voldoen aan bepaalde randvoorwaarden.**

**De beschreven dierproeven zijn duidelijk wat betreft de uit te voeren handelingen en daarmee gepaard gaande ongerief voor het individuele dier. In de overgrote meerderheid van de gevallen zijn het de experimentele procedures, en niet de aard van de ziekteverwekker of het antigeen, die de mate van welzijnsaantasting van de proefdieren bepalen (zie C11). De eenvormigheid qua design en het routinematige karakter van de dierexperimenten, is volgens de DEC één van de redenen waarom dit project als een toetsbare eenheid kan worden beschouwd.**

- 2.** Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Flora- en faunawet). **Voor zover bekend bij de DEC zijn er geen aspecten in de aanvraag die niet in overeenstemming zijn met andere wet- en regelgeving.**
  
- 3.** Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. **De DEC is van mening dat de genoemde doelcategorie "translationeel" aansluit bij de hoofddoelstelling. In deze fase is nog geen sprake van wettelijk verplicht onderzoek, al realiseert men zich bij het design van de experimenten in deze fase al wel terdege dat in een volgende fase wettelijk verplicht onderzoek zal moeten worden gedaan.**

#### *Belangen en waarden*

- 4.** Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*). **Het directe doel van het project is het ontwerpen van nieuwe en verbeterde vaccins tegen infectieziekten bij herkauwers en oriënterende studies uitvoeren met deze vaccins met het oog op de hierna volgende development fase. Het**

**uiteindelijke doel is het reduceren of voorkomen van infecties bij herkauwers en bij zoonotische micro-organismen door nieuwe of verbeterde vaccins op de markt te brengen. Er is een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. Het directe doel is gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.**

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*) **De belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn de proefdieren, de aanvrager en de doeldieren (herkauwers), hun eigenaren en de maatschappij in het algemeen. De proefdieren in het project zullen verschillende niveaus van ongerief ondergaan, waardoor hun welzijn wordt aangetast. De uiteindelijke doeldieren (herkauwers) zal veel stress en ongerief bespaard blijven, omdat de vaccins bescherming tegen infecties zullen bieden. De aanvrager heeft een aanzienlijk economisch belang bij het ontwerpen van nieuwe en verbeterde vaccins voor herkauwers teneinde zijn bestaande product portfolio uit te breiden en te verbeteren. Ook de veehouders die hun dieren laten vaccineren hebben een aanzienlijk economisch belang, maar zeker ook een belang vanuit hun zorg voor de dieren, bij het beschikbaar komen van goede (combinatie)vaccins die tijdens zo min mogelijk vaccinatiemomenten kunnen worden toegediend. De samenleving en de burgers hebben een direct belang bij het terugdringen van het gebruik van antibiotica in de veehouderij, iets waar vaccins aan bijdragen. Een aantal van de vaccins beschermt de dieren tegen zoönoses die ook voor de mens een bedreiging vormen.**
6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wet- en regelgeving op het gebied van het omgaan met voor het milieu risicovolle stoffen of organismen. **Er is geen sprake van substantiële milieueffecten. Bij het onderzoek met ziekteverwekkende micro-organismen wordt gewerkt in overeenstemming met de geldende wet- en regelgeving voor inperking van deze organismen. Dieren die gevaccineerd zijn met niet geregistreerde vaccins of die gechallenged zijn met ziekteverwekkers worden, op grond van bestaande wettelijke regels, gedood om te voorkomen dat producten van die dieren (zoals vlees en melk) in de voedselketen terecht komen.**

*Proefopzet en haalbaarheid*

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*). **De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en infrastructuur beschikt om de doelstelling van het onderzoek binnen de gevraagde termijn te realiseren. Dit wordt ondersteund door het feit dat de aanvrager al eerder succesvol vaccins voor herkauwers heeft ontwikkeld.**
8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*). **De DEC is van mening de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Het onderzoek wordt voor het grootste deel, maar niet alleen, uitgevoerd in de doeldiersoorten, met**

**uitzondering van de dierproeven in bijlage 3 waar in andere diersoorten testen worden ontwikkeld en biomaterialen die nodig zijn voor het onderzoek worden verzameld. Uitvoering van het onderzoek in het doeldier waarborgt directe toepasbaarheid van de resultaten. Het opzetten van infectiemodellen met in het veld aangetroffen nieuwe (varianten van) ziekteverwekkers en het uitvoeren van oriënterende veiligheids- en effectiviteitsstudies vindt steeds plaats volgens vaste en beproefde procedures. Het behalen van de directe doelstellingen is vooral afhankelijk van het strikt volgen van die beproefde procedures. De commissie heeft op grond van eerdere ervaring met toetsing van het onderzoek van de aanvrager er vertrouwen in dat er desondanks ruimte is om nieuwe inzichten op het gebied van de drie V's door te voeren in het onderzoek. De aanvrager heeft zeer veel ervaring met dit type onderzoek.**

*Welzijn dieren*

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).
- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e, lid 2)
  - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
  - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
  - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)
- Voor dit onderzoek is het gebruik van de uiteindelijke doeldiersoorten (runderen, geiten, schapen) onvermijdelijk. Het is gebruikelijk daarvoor dieren aan te kopen die niet speciaal voor dierproeven zijn gefokt.**
10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. **De te gebruiken dieren worden in principe gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen gesteld in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU. In een aantal gevallen is (tijdelijk) individuele huisvesting noodzakelijk om overdracht van ziekteverwekkers op andere dieren te voorkomen. Ook is in sommige gevallen om wetenschappelijk redenen niet mogelijk om de dieren bedding te geven. Dit komt overeen met wat in dit type onderzoek (infectiestudies) gebruikelijk is en is voldoende onderbouwd.**
11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). **Het ongerief van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De dieren in de voorgestelde experimenten worden onderworpen aan infectiestudies en vaccinatiestudies waarin wordt gekeken naar immunogeniteit, veiligheid en werkzaamheid (challenges). In een zeer groot deel van de gevallen leidt dat tot licht of matig ongerief (respectievelijk 48% en 43%), dat vooral bepaald wordt door de bekende**

**routinematige procedures die deel uitmaken van deze experimenten: toediening van het vaccin, monsternames, toediening van de ziekteverwekker en observatie van symptomen. In een veel kleiner deel van**

- 12. de gevallen is het nodig om de dieren in het kader van werkzaamheidsstudies te challengen met ziekteverwekkers die ernstige ziekteverschijnselen kunnen veroorzaken. Daarbij dient te worden aangetekend dat veel van de dieren die met deze ziekteverwekkers worden gechallenged beschermd zullen zijn door het te testen vaccin. Een ernstige aantasting van het welzijn zal zich naar verwachting alleen voordoen in onbeschermdo controledieren of dieren die door een lage dosis van het vaccin niet volledig beschermd zijn (maximaal 9% van het totaal aantal dieren in de aanvraag). De aard van deze verschijnselen is voor alle gangbare ziekteverwekkers bekend en in de loop van vele jaren zijn bij de aanvrager in nauwe samenspraak tussen onderzoekers, proefdierdeskundigen/IvD en de DEC strikte criteria voor humane eindpunten ontwikkeld. Voor alle dieren in de projectaanvraag geldt dat navolgbaar is in welk soort experiment zij zullen worden ingezet, welke handelingen ze zullen ondergaan en welke gevolgen dat heeft voor hun welzijn.**

**De kans dat er binnen de looptijd van dit project nieuwe ziekteverwekkers zullen worden aangetroffen is reëel, maar niet heel groot. Aangezien niet vooraf bekend is hoeveel ongerief de infectiemodellen voor deze nieuwe ziekteverwekkers zullen veroorzaken, is voor de zekerheid uitgegaan van ernstig ongerief. Het betreft een beperkt aantal dieren van het totaal en gezien het belang van het zo snel mogelijk indammen van nieuwe infectieziekten, acht de DEC een beperkte mate van onzekerheid over ernst en aard van het ongerief aanvaardbaar.**

- 13. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (zie bijlage I voor voorbeeld). **Elke dierproef vormt, door de vrijheidsbeperking en de aantasting van de lichamelijke integriteit voor instrumentele doeleinden, een aantasting van de integriteit van het dier. Het toedienen van vaccins, het afnemen van bloed en het toedienen van ziekteverwekkers en de gevolgen daarvan, kunnen natuurlijk beschouwd worden als een aantasting van de integriteit van de dieren (opzettelijk ziek maken), maar de DEC is van oordeel dat bij deze handelingen het ongerief (de welzijnsaantasting) op de voorgrond staat. De aantasting van de integriteit van de dieren is daarmee vergeleken beperkt.****

- 14. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). **De aard van de ziekteverschijnselen is voor alle gangbare ziekteverwekkers bekend en in de loop van vele jaren zijn bij [REDACTED] in nauwe samenspraak tussen onderzoekers, proefdierdeskundigen/IvD en de DEC strikte criteria voor humane eindpunten ontwikkeld. Voor elk werkprotocol worden de humane eindpunten en de eindverantwoordelijkheid voor het toepassen daarvan, tot in detail afgestemd met de IvD.****

3V's

- 15. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). **Er zijn (nog) geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. Herkauwers****

**als runderen en schapen zijn in veel van de experimenten zowel proefdier als doeldier. Bovendien hebben de voorgestelde veiligheids- en werkzaamheidsstudies een sterk routinematig karakter. Bij de opzet en uitvoering wordt vaak noodzakelijkerwijs vooruitgelopen op de wettelijk verplichte experimenten die moeten worden verricht in het kader van de registratie van de vaccins. Van die laatste experimenten is het design in veel gevallen tot in detail door de autoriteiten voorgeschreven of met de autoriteiten afgesproken. Er is er (nog) geen zinvol vervangingsalternatief voor deze experimenten. Daar waar mogelijk wordt gebruik gemaakt van *in vitro* experimenten.**

- 16.** Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). **Het aantal benodigde dieren wordt bepaald door in voorbereidende experimenten een goed beeld te vormen van de spreiding in de respons van de individuele dieren op het vaccin en/of de ziekteverwekker. Met behulp van die gegevens kan op basis van een statistische berekening worden bepaald welke aantallen dieren nodig zijn voor significante resultaten in vervolgonderzoek . De aanvrager heeft op basis van eerdere ervaring met dit soort experimenten een realistische inschatting gemaakt van het totaal aantal te gebruiken dieren. Het betreft voor dit onderzoeksveld gebruikelijke aantallen dieren per groep.**
- 17.** Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). **De aard van de verwachte ziekte symptomen is voor het merendeel van de ziekteverwekkers bekend en er zijn strikte criteria voor humane eindpunten ontwikkeld. Verder zullen er reagentia ontwikkeld worden om immunologische en serologische assays voor antigeen detectie en -kwantificering op te zetten. Tevens zal onderzocht worden of deze reagentia ook gebruikt kunnen worden om de challenge experimenten om te kunnen zetten in experimenten waarin op basis van analyse van bloedmonsters de werkzaamheid van een vaccin kan worden bepaald. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.**
- 18.** Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe. **Het betreft unieke door de aanvrager te ontwikkelen vaccins. De aanvrager zal in alle fasen van het onderzoek de proeven zo ontwerpen dat ze voldoen aan wettelijke eisen voor markttoelating.**

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

- 19.** Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*). **Binnen dit project zullen in principe dieren van beide geslachten in de experimenten gebruikt worden. Daar waar**

**richtlijnen het gebruik van een bepaald geslacht voorschrijven zullen de betreffende richtlijnen gevolgd worden. De DEC is van oordeel dat het voor de hand ligt dat vaccins die bijvoorbeeld bedoeld zijn voor dieren die lacteren of drachtig zijn, getest worden in de vrouwelijke doeldieren. In het geval van ██████ en ██████ verdient het (op grond van eerdere ervaringen) de voorkeur om alleen met vrouwelijke dieren te werken om vechten bij mannelijke dieren te voorkomen. De mannelijke dieren solitair huisvesten, zodra het vechten zich voordoet, is geen acceptabele oplossing, omdat het vaak langdurige experimenten betreft. Ook moeten alle dieren dan solitair gehuisvest worden om te voorkomen dat de spreiding toeneemt. Vechten kan verder leiden tot extra uitval van dieren en mislukken van de experimenten.**

- 20.** Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). **In het project zullen een aantal (maar niet alle) dieren worden gedood aan het einde van het experiment. De DEC is er van overtuigd dat dit alleen gebeurt als het voor de doelstelling noodzakelijk is om na afloop van de proef weefsels te isoleren of als de dieren met ziekteverwekkers of niet geregistreerde vaccins behandeld zijn en mogelijk een gevaar vormen voor hun omgeving of het milieu. De aanvrager gebruikt methoden die beschreven zijn in bijlage IV van de richtlijn 2010/63/EU.**
- 21.** Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. **In alle gevallen waarin het niet noodzakelijk is om de gebruikte landbouwhuisdieren te doden (zie criteria onder C19), wordt de mogelijkheid van hergebruik actief onderzocht. In veel gevallen wordt hergebruik ook gerealiseerd.**

NTS

- 22.** Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd? **De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en is duidelijk geformuleerd.**

## **D. Ethische afweging**

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*). **Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?**
2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste

belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden*).

**Voor het merendeel van de dieren (91%) die gebruikt worden in de voorgestelde experimenten leiden de experimenten tot licht of matig ongerief en een beperkte aantasting van hun integriteit. Als de werkzaamheid van de vaccins wordt getest kan dit voor een beperkt deel van de dieren (9% van het totaal) leiden tot ernstig ongerief, omdat in de infectieproeven en challengeproeven niet gevaccineerde (controle)dieren moeten worden meegenomen. De onderzoekers doen de challengeproeven slechts als er geen alternatief voorhanden is. De duur en de ernst van het ongerief worden door de onderzoekers zoveel mogelijk beperkt.**

**Daar staat tegenover dat beschikbaar komen van nieuwe of verbeterde vaccins tegen infectieziekten zal bijdragen aan het verminderen van de kans op het uitbreken van infectieziekten in de doeldieren. Dit bespaart grote aantallen dieren veel leed.**

**De aanvrager heeft een groot economisch belang bij het op de markt kunnen brengen van nieuwe en verbeterde vaccins. Dierproeven in de doeldiersoorten zijn nodig voor het onderzoek naar de eigenschappen van de ziekteverwekkers en naar voor het ontwikkelen van vaccins.**

**De houders en eigenaren van de dieren hebben eveneens een groot economisch belang bij het beschikbaar komen van goede vaccins tegen een gunstige prijs. Bij een ziekte-uitbraak op hun bedrijf leiden ze grote economische en immateriële schade. Als zij hun dieren goed kunnen beschermen verbetert dat hun concurrentiepositie. Ook hebben veehouders vanuit hun zorg voor de dieren belang bij het beschikbaar komen van goede vaccins.**

**Ziekte-uitbraken bij herkauwers kunnen in een samenleving waarin het houden van runderen en schapen voor de productie van vlees en zuivel een grootschalige economische activiteit is, tot ernstige ontwrichting van die samenleving leiden en voor grote economische schade zorgen, ook buiten de veehouderij. Het kunnen beschikken over goede vaccins is een substantieel belang. De aanvrager draagt daar met dit onderzoek aan bij.**

**Tot slot dragen vaccins bij aan een beperking van het gebruik van antibiotica in de veehouderij en, voorzover de vaccins bescherming bieden tegen zoönoses, beschermen ze ook mensen tegen het oplopen van zoönoses. Het maatschappelijk belang daarvan is groot.**

**De DEC acht de economische belangen van de aanvrager en van de dierhouders op zich legitiem en zij leggen zeker enig gewicht in de schaal, maar alleen in combinatie met het grote maatschappelijk belang en de voordelen voor de doeldieren, namelijk betere vaccins en minder vaccinatiemomenten, rechtvaardigen ze het gebruik van de dieren in de experimenten.**

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

**doelstellingen beschreven in het projectvoorstel "Research of new ruminant vaccines". Volgens de DEC wegen de voordelen voor de doeldieren, de samenleving, de aanvrager en de houders van de dieren gezamenlijk zwaarder**



**dan de nadelen voor de gebruikte proefdieren. Het project is goed opgezet. Verder is de DEC van mening dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om te kunnen voldoen aan de 3V beginselen en dat de aanvrager ervoor zal zorgen dat het ongerief van de proefdieren zoveel mogelijk beperkt zal worden. Gelet op het bovenstaande is de DEC unaniem van oordeel dat voor het project "Research of new ruminant vaccines" het gebruik van de proefdieren gerechtvaardigd is.**

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

**De DEC adviseert de vergunning te verlenen.**

x De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

x Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificieer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*). **Het advies is unaniem tot stand gekomen**

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

**De aanvrager stelt in de aanvraag: "One aspect is however constant across the whole ruminant health market: the trend for increasing animal productivity and growing farm/herd size, which is worsening the impact of infectious diseases". De DEC wil in dat verband opmerken dat dit advies is geschreven vanuit het perspectief van een samenleving waarin de grootschalige productie van vlees en zuivel tegen een zo laag mogelijke prijs een geaccepteerde economische activiteit is. Op de wereldwijde markt is de concurrentiedruk groot. Wanneer die economische context als een onontkoombaar gegeven wordt aangenomen, dan weegt het belang van dit onderzoek op tegen het ongerief van de dieren die er voor gebruikt worden.**

**Het is de unanieme mening van de DEC dat de druk om zo goedkoop mogelijk (en per dier zo veel mogelijk) te produceren tot niet optimale leefomstandigheden en relatief kwetsbare dieren leidt. Vooral bij runderen (melkvee en kalveren) is dit het geval. Een relatief kwetsbare gezondheid en niet optimale leefomstandigheden kunnen op zichzelf al bijdragen aan het ontstaan van ziekten.**

**De DEC zou het betreuren als het beschikbaar komen van steeds betere vaccins tegen allerlei ziekten bij herkauwers ertoe leidt dat er niets gedaan wordt om de leefomstandigheden en de robuustheid van de dieren te verbeteren. Het**

14 juli 2016

**beter afstemmen van de leefomstandigheden op de natuurlijke behoeften van de dieren zal weliswaar niet in alle gevallen (volledig) het uitbreken van ziekten kunnen voorkomen, en dus ook vaccins niet overbodig maken, maar het kan wel het welzijn van de dieren aanmerkelijk verbeteren. De DEC van de aanvrager zou het toejuichen wanneer dit in striktere richtlijnen wordt vastgelegd.**



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**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  
AVD2210020171629  
**Bijlagen**  
2

Datum 2 mei 2017  
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven



Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 mei 2017. Het gaat om uw project "Research of new ruminant vaccines". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD2210020171629. 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:**

2 mei 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD2210020171629

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**  
2 mei 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD2210020171629

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 22100

Naam instelling of organisatie: [REDACTED]

Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]

KvK-nummer: [REDACTED]

Straat en huisnummer: [REDACTED]

Postbus: [REDACTED]

Postcode en plaats: [REDACTED]

IBAN: [REDACTED]

Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]

Functie: [REDACTED]

Afdeling: [REDACTED]

Telefoonnummer: [REDACTED]

E-mailadres: [REDACTED]

**Datum:**  
2 mei 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD2210020171629

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 september 2017  
Geplande einddatum: 1 september 2022  
Titel project: Research of new ruminant vaccines  
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar nieuwe vaccins tegen ziektes bij herkauwers  
Naam DEC: [REDACTED]  
Postadres DEC: [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.541,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

[REDACTED]

Datum:

2 mei 2017

**Datum:**

2 mei 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD2210020171629



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**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  
AVD2210020171629  
**Bijlagen**  
2

Datum 2 mei 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 2 mei 2017  
Vervaldatum: 1 juni 2017  
Factuurnummer: 171629

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD2210020171629	€ 1.541,00

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



**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  
AVD2210020171629

Datum 10 mei 2017  
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven



Op 2 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Research of new ruminant vaccines" met aanvraagnummer AVD2210020171629. 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**

Kunt u per infectie of -groep aangeven hoe vaak deze voorkomt en wat de impact van de infectie is op de dieren? Kunt u ook aangeven of er al vaccins aanwezig zijn tegen deze infectie en waarom het nodig is nieuwe vaccins te ontwikkelen?

Bij uw strategie mist een onderbouwing van de keuzemomenten. Het is niet helder wanneer welke keuze gemaakt wordt. Bijvoorbeeld, wat is al bekend van de vaccins die u in vivo wilt gaan testen, voordat u deze vaccins in een dierproef gaat testen. Wanneer besluit u een nieuw diermodel op te zetten of een bestaand diermodel te verbeteren?

Wanneer besluit u niet verder te gaan met de ontwikkeling van een bepaald vaccin? Welke strategie zult u volgen voor optimalisatie van reeds bestaande vaccins en welke voor nieuw te ontwikkelen vaccins?

Kunt u voor alle Bijlage Dierproeven aangeven om welke redenen de huisvesting van dieren zonder substraat zal zijn, welke afweging wordt hierbij

gemaakt?

Hoeveel dieren ondergaan in Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 matig ongerief vanwege herhaling van handelingen?

Kunt u voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.3 aangeven hoeveel dieren welk ongerief zullen ondergaan? Kunt u aangeven welke infectiemodellen zullen leiden tot ernstig ongerief? U noemt enkele voorbeelden, maar kunt u dit uitbreiden?

Kunt u voor Bijlagen 3.4.4.3 met wetenschappelijke argumentatie aangeven waarom mannelijke dieren niet gebruikt kunnen worden in het experiment? Ongerief als gevolg van individuele huisvesting is niet voldoende argumentatie. Als onvoldoende is onderbouwd waarom het gebruik van één geslacht nodig is, kan de CCD een voorwaarde opleggen dat beide geslachten in gelijke mate gebruikt moeten worden.

Kunt u de humane eindpunten in alle Bijlage Dierproeven beter beschrijven, inclusief ziektespecifieke humane eindpunten?

Hoeveel vaccins/ infecties verwacht u in totaal te onderzoeken?

Kunt u dit verwerken in nieuwe Bijlagen Dierproeven en een nieuw Projectvoorstel?

### **Leges**

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

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

### **Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuur 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. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

**Datum:**

10 mei 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD2210020171629

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

**Datum:**

10 mei 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD2210020171629

Geachte CCD,

Bijgevoegd zijn de antwoorden op gestelde vragen vanuit CCD n.a.v. brief 10 mei 2017. Uw referentie is: Aanvraagnummer AVD2210020171629 m.b.t Project: Research of new ruminant vaccines.

In groen zijn de antwoorden weergegeven. Naar aanleiding van deze vragen zijn ook de documenten Project proposal, Bijlagen beschrijving dierproeven en de NTS aangepast. Ook hierin zijn de aanpassingen met groene tekst weergegeven.

We hopen u hiermee voldoende geïnformeerd te hebben. Indien er nog vragen zijn, dan vernemen wij deze graag.

Met vriendelijke groeten,

[Redacted signature block]

Op 2 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Research of new ruminant vaccines" met aanvraagnummer AVD2210020171629. 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.

**Vraag: Onduidelijkheden**

Kunt u per infectie of -groep aangeven hoe vaak deze voorkomt en wat de impact van de infectie is op de dieren? Kunt u ook aangeven of er al vaccins aanwezig zijn tegen deze infectie en waarom het nodig is nieuwe vaccins te ontwikkelen?

**Antwoord:**

Dit vaccine onderzoek project richt zich enkel op ziektes, die een beduidende impact op de herkauwer (rund, schaap, geit) industrie hebben (dierenwelzijn, productieverlies of behandelingskosten) en / of impact op humane gezondheid (zoönoses en reductie in het gebruik van antibiotica). Over het algemeen zal er alleen gewerkt worden aan ziektes met hoge incidentie in de (Europese) runderpopulatie of aan exotische ziektes, die een bedreiging voor de Europese runderpopulatie vormen.

Onder het kopje "Diseases within the Ruminant Vaccine Research Project" (3.1.

Background) is hierover uitleg toegevoegd, tevens is voor de specifieke ziektes, indien van toepassing, informatie over incidentie, impact en / of beschikbaarheid en noodzaak voor vaccins toegevoegd.

**Vraag:**

Bij uw strategie mist een onderbouwing van de keuzemomenten. Het is niet helder wanneer welke keuze gemaakt wordt. Bijvoorbeeld, wat is al bekend van de vaccins die u in vivo wilt gaan testen, voordat u deze vaccins in een dierproef gaat testen. Wanneer besluit u een nieuw diermodel op te zetten of een bestaand diermodel te verbeteren? Wanneer besluit u niet verder te gaan met de ontwikkeling van een bepaald vaccin? Welke strategie zult u volgen voor optimalisatie van reeds bestaande vaccins en welke voor nieuw te ontwikkelen vaccins?

**Antwoord:**

Zoals reeds in de project proposal bij 3.4.3. aangegeven, zullen enkel projecten met een aannemelijke marktverwachting en kans op success opgestart worden.

Ter verduidelijking wordt de betreffende zin in 3.4.1. ook in toegevoegd: "At the company,

*all R&D projects are subject to regular review by the R&D Governance Body. Only research projects with reasonable market expectation and probability of success will get approval to start the research phase.*

*At the start of a research project, the project team agrees on the types of studies to be performed and the requirements for the studies”.*

Verder is onder 3.4.3. informatie toegevoegd over verschillende keuzemogelijkheden omtrend de verschillende type studies (zie document).

Vraag:

Kunt u voor alle Bijlage Dierproeven aangeven om welke redenen de huisvesting van dieren zonder substraat zal zijn, welke afweging wordt hierbij gemaakt?

Antwoord:

Bij [REDACTED] infectiemodellen is het noodzakelijk, de faeces schoon te verzamelen, om deze visueel goed te kunnen beoordelen en bij voorbeeld de droge stof en / of de totale hoeveelheid faeces te kunnen bepalen. In dit type studies kan er daarom geen substraat aangeboden worden. Tekst in Bijlage Beschrijving Dierproeven is bij 3.4.4.1 en 3.4.4.2. als volgt aangepast:

*‘In a few cases [REDACTED], it is necessary to use no bedding because of scientific reasons’.*

Dit is niet van toepassing voor Bijlage Beschrijving Dierproeven 3.4.4.3.

Vraag:

Hoeveel dieren ondergaan in Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.3 matig ongerief vanwege herhaling van handelingen?

Antwoord:

Bij de beoordeling van het ongerief vanwege herhaling van handelingen werd voor de meeste procedures in eerste instantie een te strenge classificatie toegepast: Het herhaaldelijk nemen van [REDACTED] of meer dan [REDACTED] keer toepassen van de volgende procedures: meten van de lichaamstemperatuur, gewicht, nemen van urine, faeces, colostrum/melk of het bemonsteren van mucosale oppervlaktes [REDACTED], [REDACTED] werd als matig ongerief beoordeeld. Aangezien het niet-invasieve handelingen betreft, is het te rechtvaardigen, het ongerief ter gevolge van herhaaldelijke toepassing van deze procedures als mild te beoordelen.

Ongerief ten gevolge van herhaaldelijke [REDACTED] [REDACTED] punctie [REDACTED] punctie van [REDACTED] of [REDACTED] is echter wel als matig te beschouwen.

In de betreffende tabel in bijlage 3.4.4.1. waarin aangegeven wordt, hoeveel dieren welke ongerief zullen ondervinden zal worden aangegeven, hoeveel dieren (%) matige ongerief ter gevolge van de herhaalde procedures ondervinden. Boven de tabellen voor infectie modellen waar deze procedures niet toegepast zullen worden, wordt de zin *“due to repeated sampling, the cumulative discomfort score for the sampling is moderate”* verwijderd.

In de betreffende tabel in bijlage 3.4.4.2. waarin aangegeven wordt, hoeveel dieren welke ongerief zullen ondervinden zal worden aangegeven, hoeveel dieren (%) matige ongerief ter gevolge van de herhaalde procedures ondervinden. Bij de tabellen voor infectie modellen waar deze procedures niet toegepast zullen worden, wordt de voetnoot <sup>2</sup>: *Although discomfort of disease is mild, overall study discomfort will be moderate as a result of repeated sampling”* verwijderd.

Onder Punt I is de tekst als volgt aangepast:

*Measurement of body temperatures and body weight, sampling urine, faeces, colostrum/milk, sampling on different (mucosal) surfaces ([REDACTED]), [REDACTED] as well as [REDACTED] and pregnancy check are part of normal farm practice/veterinary care and will induce only mild discomfort. If the following procedures [REDACTED] [REDACTED] are repeated the discomfort is considered to be*

*moderate.*

De verdeling van dieren over de verschillende ongeriefscores in de NTS zal ook worden aangepast.

Vraag:

Kunt u voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.3 aangeven hoeveel dieren welk ongerief zullen ondergaan? Kunt u aangeven welke infectiemodellen zullen leiden tot ernstig ongerief? U noemt enkele voorbeelden, maar kunt u dit uitbreiden?

Antwoord:

Naar aanleiding van uw vraag realiseren we ons, dat de tekst mogelijk misleidend is. Er zijn infectie modellen die tot ernstig ongerief leiden ( ██████████ ██████████ ), echter verwachten we gedurende de komende 5 jaar geen van deze modellen toe te passen. We verwachten dat niet meer dan ██████ van de dieren matig ongerief zal ondervinden, ten gevolge van de handelingen of de infectie.

De tekst is als volgt aangepast:

*'Discomfort will be mild ( $\geq 75\%$ ) to moderate ( $\leq 25\%$ ) depending on the number of sampling points, type of biotechnical procedure and whether the challenge infection causes disease in the model animal'.*

Vraag:

Kunt u voor Bijlagen 3.4.4.3 met wetenschappelijke argumentatie aangeven waarom mannelijke dieren niet gebruikt kunnen worden in het experiment? Ongerief als gevolg van individuele huisvesting is niet voldoende argumentatie. Als onvoldoende is onderbouwd waarom het gebruik van één geslacht nodig is, kan de CCD een voorwaarde opleggen dat beide geslachten in gelijke mate gebruikt moeten worden.

Antwoord:

Bij de in bijlage 3.4.4.3 beschreven experimenten is standaardisatie van uitgesproken belang. Bij gebruik van dieren van beide geslachten wordt een additionele variable in de proefopzet toegevoegd, wat onvermijdelijk tot een grotere variabiliteit in de resultaten zal leiden. Om de zelfde mate aan betrouwbaarheid van de resultaten te waarborgen zou het aantal dieren dat per experiment nodig is verhoogd moeten worden. Gebruik van alleen vrouwelijke dieren leidt tot het totaal laagst mogelijk aantal dieren.

Vraag:

Kunt u de humane eindpunten in alle Bijlage Dierproeven beter beschrijven, inclusief ziektespecifieke humane eindpunten?

Antwoord:

Onderstaande informatie is toegevoegd in alle bijlagen:

*General humane endpoints are applicable to all animals, irrespectively of the type of experiment.*

General Humane Endpoints:

- *The animal experiences more than minor additional discomfort as a consequence of conditions resulting in long term or non-reversible inability to eat and or drink autonomously, fast or long lasting loss of weight, diseases or conditions that cause severe pain, suffering or discomfort such as bone fractures, force unnatural positioning and / or movements, open wounds or abscesses.*
- *Scientific endpoints: The target of the study reached / all planned samplings have been performed*
- *(Reliable and useful) results cannot be reached for reasons unrelated to the study*

Onderstaande informatie is toegevoegd in alle bijlagen betreffende infectiestudies:

Specific humane endpoints after infection with bovine pathogens

- In general, disease specific clinical signs (for example ██████████ or ██████████ signs) do not normally lead to humane endpoints, but they may affect the general

health of the animal (i.e. high fever, dullness, anorexia) leading to humane endpoints if

- severe general clinical signs last for at least 2 days or the body temperature drops rapidly
- the animal is unable to stand up and eat/dring actively for more than 1 day
- In the reproductive infection models, calving or abortion are humane endpoints.

Vraag

Hoeveel vaccins/ infecties verwacht u in totaal te onderzoeken?

Antwoord

We verwachten gedurende de komende 5 jaar met [REDACTED] pathogenen development studies te verrichten (in vele gevallen zal een vaccin antigenen van meerdere pathogenen bevatten).

Zin toegevoegd in project plan onder kop 3.4. *"It is expected that [REDACTED] pathogens will be investigated within this project"*



## Form Project proposal

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

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

#### Rationale

Ruminants represent around 32% of the global animal health market, with vaccines being a key segment in the ruminant health market. This market is extremely diverse: the most important species of farmed ruminants are cattle, sheep and goat, but in certain regions, also buffalo, deer, and camels are raised in



an agricultural setting. The husbandry and management systems vary between species and also on whether the animals are kept for meat, milk or wool production. By consequence, a broad and diverse portfolio of ruminant vaccines is required to fulfil the specific needs for the different markets. One aspect is however constant across the whole ruminant health market: the trend of increasing animal productivity and growing farm/herd size, which is worsening the impact of infectious diseases. Vaccination is widely applied to control infectious diseases, leading to a reduction in the amount of antibiotics used and better wellbeing for the animals.

The company is constantly striving to strengthen its portfolio of ruminant vaccines by improving existing vaccines and developing new ones. New fields of vaccine research may include microorganisms that are by themselves harmless for ruminants, but animals are vaccinated to reduce the risk of infection for humans for example in case of [REDACTED] diseases or other zoonoses. Vaccination for other reasons such as the [REDACTED] or other targets that are not infectious agents are out of scope for this application.

Each pathogen has its own specific mechanism of pathogenesis and protection through vaccination requires specific immune responses, either humoral, through cellular immunity, or a combination thereof. For this reason, new vaccines are to a large extent "tailor-made". Where possible, knowledge acquired with other pathogens / vaccines is used to design candidate vaccines in order to increase the likelihood of success and thereby minimize the numbers of animals needed during the whole development process of a new vaccine. Vaccines can be either live attenuated pathogens, (components of) inactivated pathogenes, [REDACTED]

Most inactivated vaccines are formulated together with an adjuvant and primarily induce a humoral response, while live (vector) vaccines typically induce both a humoral and cellular response. The attenuation of live vaccines can be accomplished by classical means (e.g. in vitro passaging or chemical mutagenesis) or by recombinant methods (GMO vaccines).

In case of diseases that affect very young animals, the mother is vaccinated in order to protect its offspring by the transfer of specific antibodies via the colostrum and milk or specific antibody preparations are added to the milk.

The two key requirements for any vaccine are (i) safety and (ii) efficacy. As vaccination is a medical treatment administered to healthy individuals, it is important that the vaccine does not cause undesired (negative) effects other than some transient minor discomfort. With regard to efficacy, the benefit in providing protection from disease and/or infection has to be demonstrated to justify the use. According to the applicable regulations in Europe and the majority of other countries, the safety and efficacy of a vaccine candidate has to be demonstrated in animal experiments. In addition, some quality control tests also require animal testing.

#### Vaccine research and development

Within a vaccine project two phases can be distinguished: the research phase and the development phase.

The research phase comprises the search for new pathogens, new adjuvants, new vaccine formulations and new [REDACTED] methods as well as expansion of the knowledge on known pathogens and technologies. For example, mechanisms of pathogenicity and natural and specifically induced immune responses or strategies of the pathogens to [REDACTED] will be investigated, protective antigens might be identified or methods of attenuation of strains to create live vaccines might be investigated. Candidate vaccines are then tested in pilot studies to determine their efficacy and safety. Based on the outcome of these studies, candidate vaccines with a fixed formulation are selected to enter the development phase.

In addition, (antigenic components of) the pathogens will be used to immunize laboratory animals to generate antibodies that can be used to set up immunological assays that are needed during the development phase

The current project proposal covers studies that are done during the research phase. The development phase is covered by a separate project proposal.

In general, the design of the development studies, including the procedures that have to be applied to demonstrate safety and efficacy of the vaccine are laid down in Guidelines and Regulations. The design and the procedures applied in the research studies are basically the same as for the development studies:

- Infection studies with new pathogens are performed to set up target animal infection models that can be used in efficacy studies in the development phase and to expand the knowledge on these



[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted text block 1]

[Redacted text block 2]

[Redacted text block 3]

[Redacted text block 4]

[Redacted text block 5]

[Redacted text block 6]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

- [Redacted list item]
- [Redacted list item]
- [Redacted list item]
- [Redacted list item]
- [Redacted list item]
- [Redacted list item]

Current products, R&D projects and historical progress

[Redacted text block]

[REDACTED]

### 3.2 Purpose

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

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

The goal of the ruminant vaccine research project is to update the current [REDACTED] vaccine portfolio in response to unmet needs in the field of ruminant livestock industry. More specifically, the aim is to identify new pathogens, expand the knowledge of known pathogens to be able to develop new (combination) vaccines and test candidate vaccines against these pathogens. The outcome of a successful research phase is the discovery of a new pathogen and/or a prototype vaccine that has shown to be safe and efficacious in the target animals (proof of concept) and will therefore later on successfully pass the development phase. In addition, (antigenic components of) the pathogens will be used to immunize laboratory animals to generate antibodies that can be used to set up immunological assays for the detection and/or quantification of the antigen/pathogen and the immune response against the antigen/pathogen (e.g. ELISAs, serotyping tests, immunohistochemistry, humoral and cellular immune responses).

### 3.3 Relevance

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

Vaccines are the most effective method for prevention or eradication of diseases. Further improvement and extension of the available vaccine range will bring safer, more efficacious vaccines, including vaccines against emerging diseases. Also, combinations of diseases can be encountered more effectively, with fewer vaccination moments (injections), when vaccines are developed that can be used at the same time or mixed with other vaccines, or even in ready to use combination products.

The prospects are that the new vaccines will further reduce animal suffering and the use of antibiotics, and will lead to reduced losses in meat and milk production and thereby to a more sustainable use of natural resources.

Acquired insight in pathogenesis and immune responses of infections will help to identify new vaccination strategies for those pathogens for which no efficacious vaccine exists at this moment.

### 3.4 Research strategy

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

At the company, all R&D projects are subject to regular review by the R&D Governance Body. Only research projects with reasonable market expectation and probability of success will get approval to start the research phase.

At the start of a research project, the project team agrees on the types of studies to be performed and the requirements for the studies.

Infection studies in the target animal (ruminants) have to be undertaken to show that a (newly isolated) infectious agent is pathogenic and fulfils Koch's postulates and to better understand the mechanisms of pathogenicity and immune response after infection. These infection studies can also form the basis for a target animal (ruminants) infection model that will be used to test the efficacy of vaccine candidates (vaccination-challenge studies). Such an infection model is needed to be able to show that a vaccine is capable to prevent or significantly reduce infection and/or clinical signs. For vaccines against some pathogens, the infection model that has to be used and the specific efficacy criteria that have to be fulfilled are prescribed in a monograph of the Ph.Eur.

Due to the complexity of vaccination-challenge studies in ruminants, the number of vaccine candidates



tested in vaccination-challenge studies is reduced as much as possible. [REDACTED]

When doing (initial) vaccination-challenge studies, it is attempted to find an [REDACTED] so that in further studies efficacy can be evaluated on the basis of [REDACTED].

Safety of vaccine candidates has also to be evaluated in the target animals (ruminants) to show that systemic and local (injection site) reactions after vaccination, if any, are acceptable. For each new vaccine, a risk-benefit analysis has to be made and the aim is to induce as little as possible discomfort by vaccination.

In the research phase, safety and [REDACTED] efficacy parameters are measured simultaneously in combined orientating efficacy and safety studies.

It is expected that [REDACTED] pathogens will be investigated within this project.

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.

The research phase for new vaccine consist of one or more of the following types of animal experiments (described in detail in appendices 1 through 3).

#### Ad 1) Infection studies

An infection model for a pathogen is developed based on the scientific literature or a Ph.Eur monograph (if available) and the experience with other pathogens within the company. In a model, it will be attempted to reproduce the clinical signs that are associated with a certain disease or syndrome. For a potentially new pathogen this will reveal if it is indeed able to induce disease (Koch's postulates). For known pathogens the model has to allow assessment of the efficacy of vaccine candidates under controlled laboratory conditions as described in Ph.Eur 5.2.7 (Evaluation of efficacy of veterinary vaccines and immunosera) or vaccine specific monographs, EU Directive 2009/9/EC amending Directive 2001/82/EC (Community code relating to veterinary medicinal products) and national guidelines and regulations outside the EU. New infection models are defined as models for newly discovered (potential) pathogens or published models that have not been used within [REDACTED] before. Improvement or refinement of existing models will be undertaken in case not all disease characteristics that are relevant for the field situation are presented in the model, or if the model shows a high variability in the level of infection/pathology within a group of infected animals and which would therefore necessitate the inclusion of large groups of animals in infection-challenge experiments in order to be able to show statistically significant differences. In case of multifactorial diseases, it might be necessary to [REDACTED] effect of [REDACTED] factors in order [REDACTED] pathogen. For this purpose, [REDACTED] drugs might be applied or the animals are co-infected with [REDACTED] pathogens.

Testing of new serotypes/pathotypes of a pathogen is also considered improvement rather than development of a new model, as the route of application etc. will be based on experience present within the company. Furthermore, refinement will also include the testing of modifications to a model with the intention to increase animal welfare (e.g. a less invasive application method).

Studies to investigate the pathogenicity and / or to develop or improve an infection model will have the following set-up:

- Administration of a (potential) pathogen, if required in combination with [REDACTED]
- Observation of clinical signs post infection/sampling (e.g. for shedding of the pathogen, immune responses against the pathogen)
- Necropsy to investigate (histo)pathological changes

The degree of discomfort will depend on the nature of the pathogen involved as the infection model is supposed to mimic the natural disease as much as possible.

#### Ad 2) Vaccination studies

Once an infection model has been established, the efficacy of candidate vaccines against a pathogen can be evaluated. When looking into the options for vaccination against a newly discovered pathogen or a pathogen for which no vaccine is available, the vaccine candidate(s) to be tested are based on the scientific literature and the knowledge within the company on pathological processes, immune mechanisms and vaccines against related pathogens to have the highest chance of success and thereby minimize the number of animals needed. This will determine whether a live or inactivated vaccine

approach will be taken. In some instances, there will be collaboration with outside partners (e.g. universities) that have specific knowledge on a (new) pathogen and that might even already have prepared and tested vaccine candidates. In addition, research on new (combination) vaccines for pathogens that are already being controlled by vaccination will also be guided by the experience gained under field conditions with the marketed product(s). An inactivated vaccine can be a whole killed microorganism or virus, or an immunogenic part of the pathogen (subunit vaccine). Also [redacted] vaccines or vaccines [redacted] fall into this category. An inactivated vaccine will be formulated with an adjuvant that is expected to be safe in the target animals (ruminants) and if applicable the laboratory animal used for the potency testing in combination with the chosen antigen(s) and will be quality control tested (e.g. for sterility) before the start of an animal experiment to reduce the chances of unwanted vaccination reactions. A live vaccine is an attenuated form of the pathogen that has been prepared by "classical methods", such as cell culture passage or chemical mutagenesis, or by targeted gene modifications with the help of recombinant-DNA techniques. Another form of live vaccines, are so called vector vaccines that consist of either or non-pathogenic microorganism or an attenuated pathogen that also contains antigen(s) of other pathogens. A live vaccine candidate will be characterized and tested for purity before the start of studies in animals. In vaccination-challenge studies using the infection model, it will be evaluated whether the vaccine candidate can provide the required protection against the pathogen in terms of reduction of infection, clinical signs and (histo)pathology. Only if a vaccine candidate gives promising results (i.e. (statistically significantly) reduces one or more aspects of a disease) it is considered for the development phase. By studying the immune response after vaccination, it will be attempted to find a correlation between the height of the immune response (e.g. as measured in in vitro virus-neutralization) and protection in the target animal (ruminant). In those instances where such a correlation can be established, candidate vaccines can be tested on the basis of that response instead of by challenge infection. However, although some vaccines are able to protect against the disease in question, the immune response measured (if any) is not always indicative of the level of protection, especially in case protective antigen(s) are unknown. If no correlate of protection is available, vaccine efficacy can only be evaluated in vaccination-challenge studies.

In order to make a proper risk-benefit analysis for a new product, all vaccines have to be tested in safety studies in the target animal (Ph.Eur 5.2.6 (Evaluation of safety of veterinary vaccines and immunosera), EU Directive 2009/9/EC amending Directive 2001/82/EC (Community code relating to veterinary medicinal products), VICH guidelines and national guidelines and regulations). Inactivated and subunit vaccines usually contain an adjuvant that enhances the immune response to the antigen(s) in the vaccine. Unfortunately, although the adjuvant preparations themselves can be considered safe, the combination of antigen and adjuvant sometimes results in unwanted systemic and/or local reactions after vaccination. Therefore, for each new inactivated or subunit vaccine the effect on the animals' general health, determined by observing clinical signs (e.g. general demeanour, body temperature, appetite etc.) and injection site reactions has to be determined. For an attenuated live vaccine, it has to be shown that it is unable to induce disease. Therefore, live vaccine candidates will be evaluated for their lack of virulence in the infection model. Testing specific gene-deleted mutants in the infection model will also provide knowledge on which antigens are required for pathology and/or survival within the host. These antigens can then be considered for an inactivated vaccine approach.

As evaluation of the safety and efficacy of vaccination will be combined in the research phase, studies will be performed according to the following basic set-up (infection will not be performed in case an immunological marker for protection can be applied):

- Administration of the candidate vaccine
- Observation of clinical signs post vaccination
- Monitoring responses (e.g. blood sampling)/persistence (e.g. shedding) in case of a live vaccine
- Infection with a pathogen (field isolate)
- Observation of clinical signs post infection/sampling (e.g. for shedding of the pathogen)
- Necropsy to investigate (histo)pathological changes

The degree of discomfort encountered directly as a result of vaccination and sampling is small and such procedures are routinely used in normal veterinary care. The one area in which a moderate to severe degree of suffering may occur is after the onset of clinical disease following infection.

### Ad 3) Assay development and preparation of biomaterials

To set-up assays that can help to detect a pathogen (e.g. by immunohistochemistry), to discriminate between different strains (e.g. serotyping) or develop immunological assays to quantify whole pathogens or specific antigens (antigenic mass and potency tests) it may be necessary to use laboratory animals for the preparation of sera or monoclonal antibodies if the required reagents are not available. For each new

vaccine, batch tests for the quantification and identification of the active ingredients are required under EU Directive 2009/9/EC amending Directive 2001/82/EC (Community code relating to veterinary medicinal products) and Ph.Eur 0062 (Vaccines for veterinary use) to verify the consistency of the manufacturing process and the final product. Preferably, *in vitro* tests are used for batch testing, but in case an *in vitro* batch potency test is not possible for a new vaccine, a serological assay in laboratory animals will have to be set up. In addition, for some vaccines for which a Ph.Eur monograph exists, a mandatory batch potency test in laboratory animals is described.

In a few of cases, determination of the protection against challenge infection is mandatory or necessary for scientific or technical reasons.

Immunization experiments of laboratory animals will generally be as follows:

- Administration of antigen/pathogen
- Collection of blood

In case of potency tests that involve challenge infection, the following additional treatments are employed

- Administration of challenge inoculum
- Clinical observation

The degree of discomfort encountered directly as a result of vaccination and sampling is small and such procedures are routinely used in normal veterinary care. In the studies without challenge, discomfort will be mild or moderate depending on the number of injection/sampling moments.

Moderate to severe degree of suffering may only occur in studies with challenge infection.

---

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.

At the company, all R&D projects are subject to regular review by the R&D Governance Body. Only research projects with a reasonable market expectation and probability of success will get approval to start the research phase.

At the start of a research project, the project team agrees on the types of studies to be performed and the requirements for the studies.

The Type of experiments and go / no-go decision points in a research vaccine project are the following:

1. Infection studies.

The appearance of new strains of a particular pathogen is often difficult to observe, and can rely on anecdotal reports from veterinarians and animal owners. Field isolates might therefore have to be tested both *in vitro* and *in vivo* to determine if significant changes in pathogenicity have occurred. Studies are performed to investigate the pathogenicity of an agent and the immune response induced by the agent. If a potential pathogen fails to fulfil Koch's postulates, the vaccine research project will be stopped.

Infection studies with field isolates are also performed to develop or improve an infection model. An infection model is required for vaccine development (see 2. Vaccination challenge studies). Reasons why an existing model needs to be improved could be that the model is too artificial and does not mimic the natural disease or because of a too large animal – to – animal variation in the results. In case of multifactorial diseases, it might be necessary to [redacted] effect of [redacted]

[redacted] factors in order to [redacted] pathogen. As it is important to have the smallest possible variation in the level of infection/clinical signs between animals to be able to work with the lowest number of animals possible in the challenge experiments performed during the development phase, improvement/refinement of the challenge model (e.g. change in the route of inoculation) may need to be undertaken. Also, when a new challenge inoculum is prepared, suitability for use in challenge studies has to be evaluated in the model. On the other hand infection studies are required to determine whether a strain is sufficiently attenuated to serve as vaccine strain. On the basis of the study results, it will be determined if a live vaccine candidate has an acceptable risk-benefit profile. Some fine-tuning of the composition (e.g. changes in dose or application route) may be necessary before the optimal vaccine has been reached (proof of concept). In some cases it may not be possible to obtain proof of concept with the available candidates and knowledge of the pathogen, which means that the research project will be stopped.

2. Vaccination challenge studies

Vaccination challenge studies can only be performed once an infection model (see point 1) is available. Orienting vaccination challenge studies are performed to get a first impression about the safety and efficacy of the vaccine candidates. It may take several rounds of experiments to test a number of vaccine candidates in order to find a candidate vaccine that has proven to be able to fulfil the required efficacy and safety criteria, the vaccine candidate can move to the development phase. If, with the knowledge available, it is impossible to produce a candidate vaccine that fulfils the criteria, further development is

stopped.

3. Studies in laboratory animals for assay development and preparation of biomaterials.

These studies can be initiated in parallel with studies mentioned under 1. And 2., but they will only be undertaken if the necessary immunological reagents are not (commercially) available. A potency test in laboratory animals (according to Ph.Eur monographs) will only be developed in case a no suitable *in vitro* test is available.

All above mentioned studies are eventually done to obtain regulatory approval for ruminant vaccines. During the regular (1-2 times per year) project reviews by the R&D Governance Body the outcome of the studies is assessed against the requirements and pre-set milestones as well as go/no-go decision points are evaluated.

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	Infection studies in ruminants
2	Vaccination challenge studies in ruminants
3	Assay development and preparation of biomaterials
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	22100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	[REDACTED]	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		1	Research: Infection studies in ruminants

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Infection studies will be performed for one of the three different reasons:

- 1) To determine the pathogenicity of new pathogens (to prove Koch's postulates), variants of known pathogens, should they appear or the role of specific genes in the pathogenicity and interaction with the host's immune system.
- 2) To develop an infection model that will be used in vaccination-infection studies to assess the efficacy of vaccine candidates (see Addendum 2).
- 3) To assess the safety profile of a live attenuated vaccine candidate obtained by "classical" means (e.g. in vitro passage or chemical mutagenesis) or gene-modification (including vector vaccines).

In general, the application of a pathogen will be done via the natural route of infection, but if the natural route does not induce all presentations of a disease under laboratory conditions, it might be necessary to use another route (e.g. parenteral injection to induce a systemic infection).

Application of a potential vaccine candidate will typically be done by the route intended as application route of the future product, but in specific cases it might be necessary to follow the route that gives highest risk of adverse events in order to make a meaningful assessment of the safety profile.

In case a pathogen or vaccine candidate might cause transplacental infection, pregnant animals at one or more specified stage of pregnancy have to be used in the infection studies. The animals are then observed until the end of pregnancy to determine the outcome of the pregnancy and the health status of the offspring. Samples might have to be taken from the offspring to determine the presence of the pathogen / vaccine candidate or specific pre-colostral antibodies. Alternatively, [REDACTED]

After inoculation of the vaccine candidate or pathogen, one or more of the following parameters will be

evaluated:

- Clinical signs (e.g. changes in general health and or disease specific symptoms and local reactions)
- Body temperature (rectal temperature)
- Body weight
- Virus, bacterial or parasites shedding (swabbing of mucosal surfaces, sampling of faeces, urine, milk), viral/bacterial/parasitic load in [REDACTED] or other tissues ([REDACTED])
- Viraemia, bacteraemia or parasitemia or haematological parameters (blood/[REDACTED] sampling)
- Post mortem examination (macroscopical and microscopical)

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

Four or more of the following procedures will be undertaken depending on the characteristics of the vaccine/ pathogen involved; the types of pathogens are described under B (in italics the frequency of the procedures):

1. Daily observation / scoring clinical signs including measurement of rectal temperature ([REDACTED] for up to [REDACTED] days)
2. Weighing [REDACTED]
3. Blood sampling [REDACTED] to determine [REDACTED] and / or to determine the presence of the pathogen or vaccine candidate in the blood
4. [REDACTED] treatment by application of [REDACTED] drugs ([REDACTED] / [REDACTED])
5. Administration of pathogen or vaccine candidate [REDACTED]
6. Swabbing of (mucosal) surfaces [REDACTED] to determine the excretion of the pathogen or vaccine candidate
7. [REDACTED] to determine the presence of the pathogen or vaccine candidate [REDACTED]
8. [REDACTED] to determine the presence of the pathogen or vaccine candidate in the [REDACTED]
9. Urine, fecal, colostrum / milk samples [REDACTED] to determine the presence of the pathogen or vaccine candidate
10. Punction of [REDACTED] ([REDACTED]) or installation of a [REDACTED]
11. Punction [REDACTED]
12. [REDACTED] biopsy [REDACTED]
13. Pregnancy check [REDACTED]
14. Euthanasia

The duration of all procedures listed above will only be minutes at most. Typically, the length of the observation period after infection is 14 to 28 days. If pregnant animals have to be followed until birth, the observation period will be longer, but in general, the total number of treatments does not increase. To rule out that clinical signs are caused by an unintended co-infection, non-infected control animals may be included in a study. In addition, in models for neonatal disease in sheep and goats, ewes/goats may be required to give birth to and foster the lambs / kids but these will not be infected.

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

In this type of initial studies, it is not obligatory to demonstrate statistically significant differences between treatment groups. However, these studies will enable an estimation of the variance between individual responses of the animals in a group at these particular observation points. Based on this information the minimum numbers of animals per group needed to demonstrate the efficacy of a vaccine during the development phase can be estimated. In this type of experiments, the group size is in general 5-8 animals, depending on the expected variation in the infection model. This group size is in line with the group size for infection studies as specified in most European Pharmacopoeia monographs on ruminant vaccines.

## **B. The animals**

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

Studies will be performed in cattle, sheep and / or goats as appropriate. Animals of both sexes can be used for this type of animal experiment unless the study has to be performed in pregnant and / or lactating animals.

Purchase of animals: The animals will be purchased from commercial suppliers, obtained from affiliated farms or bred at [REDACTED] facilities.

If a certain microbial status is required, animals will be purchased from farms with the respective (certified) microbiological status and / or screened prior to inclusion in the study.

If the study design requires that animals are vaccinated and / or infected [REDACTED] or when only a [REDACTED], the young animals have to be [REDACTED] accordingly from the farms of birth to the testing facility.

### Special requirements

If young animals with a specific antibody status are required, it is often necessary to warrant that [REDACTED]. As these [REDACTED] animals are more susceptible for intercurrent infections, they receive [REDACTED] treatment. With the exception of studies against [REDACTED] pathogens, [REDACTED] can be given to the animals from [REDACTED] onwards as an aid in the prevention of [REDACTED]

### Age of animals:

Age of the animals for vaccine research varies from a few hours old to adult. The age of the animals to be used should be the age at which clinical disease is expected or the minimal age recommended for use of the vaccine.

If the infection has to be done in very young lambs or kids, it might be necessary to include the ewes / goats to foster the lambs / kids. In order to study transplacental spread of the pathogen or vaccine

candidate it may be necessary to include dams in one or more specific trimester of pregnancy. Samples might have to been taken from the offspring, for certain studies, euthanasia of the offspring might be required.

The tables below specify which models would be used for the different pathogens that might be included in infection studies during the research projects over the next 5 years. The lists are more extensive than the actual portfolio will be, but it is not possible at this moment to predict exactly which pathogens will be worked on.

The animal categories listed are the age groups considered to be most sensitive and therefore have to be used to perform the basic efficacy and safety studies.

Priorities within the R&D portfolio are based on market needs and the estimated likelihood of success of obtaining a vaccine candidate that fulfills the required product profile. Priorities can shift upon identification of new unmet needs in the field. For example, if a new [REDACTED] pathogen with substantial impact on the ruminant industry is discovered, this will be given priority over research into a second generation improved product for a [REDACTED] pathogen.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
New pathogen	Cattle <6 Months old	Severe (max 70%) <sup>1</sup>	Max 2 wk

<sup>1</sup>: Studies with potential new pathogens are given the highest expected discomfort score until the severity of clinical signs has been established

[REDACTED]

[REDACTED]



Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
██████████	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 2 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 2 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Severe (max 50%)	Max ± 2 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
New pathogen	Cattle <6 Months old	Moderate (max 100%) <sup>2</sup>	Max 2 wk

<sup>1</sup>Vaccines are given to ██████████ in order to ██████████. This part of the study does only cause mild discomfort. The information given in the table above relates to the discomfort during challenge studies ██████████ will be determined.

<sup>2</sup>: Studies with potential new pathogens are given the highest expected discomfort score until the severity of clinical signs has been established

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
██████████	Adult cows	Moderate (max 50%)	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Moderate (max 50%)	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Mild	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Mild	Max 2 wk
██████████	Adult ewes	Mild	Max 2 wk
██████████	Adult ewes	Mild	Max 2 wk
New pathogen	Adult cows	Moderate (max 100%) <sup>1</sup>	Max 2 wk
New pathogen	Adult ewes	Moderate (max 100%) <sup>1</sup>	Max 2 wk

<sup>1</sup>: Studies with potential new pathogens are given the highest expected discomfort score until the severity of clinical signs has been established

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
██████████	Adult cows	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Severe (max 50%)	Max 1 wk
██████████	Adult cows	Severe (max 50%)	Max 1 wk
██████████	Adult cows	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Severe (max 50%)	Max 1 wk
New pathogen	Adult cows	Severe (max 100%) <sup>1</sup>	Max 1 wk



	Moderate	■	■
	Severe	■	■
Sheep	Mild	■	■
	Moderate	■	■
	Severe	■	■
Goat	Mild	■	■
	Moderate	■	■
	Severe	■	■

\*: Discomfort due to disease

\*\* : Including [redacted]

\*\*\*: Due to repeated procedures the overall discomfort will be moderate in at most 50% of the animals

In the infection studies, one or more groups are compared to an uninfected control group. The group size is dependent on the disease model. In general, the group size used will be [redacted] but could be larger depending on the expected variation in the infection model. The expected numbers per category of vaccine are:

Per Model	Cattle <6Months	Adult cattle	Sheep <6Months	Adult sheep	Goat <6Months	Adult goat
[redacted]	■	■	■	■	■	■
[redacted]	■	■	■	■	■	■
[redacted]	■	■	■	■	■	■
[redacted]	■	■	■	■	■	■
[redacted]	■	■	■	■	■	■
[redacted]	■	■	■	■	■	■
[redacted]	■	■	■	■	■	■
[redacted]	■	■	■	■	■	■
[redacted]	■	■	■	■	■	■

**C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

Re-use might be considered for animals that experience only minor discomfort during the first study, for example uninfected control animals. This approach is considered acceptable especially in case of animals that were raised under special conditions (e.g. [redacted]) to achieve a certain [redacted] status

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

xNo

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.

**Replacement:**

In accordance with international regulations, animals of the target species must be used to demonstrate the safety and efficacy of a vaccine because there are no suitable alternatives or models for the induction of immunity in a whole organism or for the infection of living tissues as complex as those found in the whole animal in which the vaccines are intended to have efficacy. Therefore, during the research phase, infection models have to be developed in the target animals-and candidate vaccines have to be tested in the same models.

**Reduction:** All studies are performed with the lowest possible number of animals that are required to enable meaningful interpretation of the results. This will be achieved through an ongoing evaluation of the observations in each study. The number of animals per study will be substantiated in each study protocol. According to internal procedures, the study protocol will be reviewed by the Animal Welfare Body and a statistician.

**Refinement:**

Where possible it is pursued to refine the routes of administration of substances and sampling techniques to improve animal welfare/to reduce discomfort of administration, but without endangering the scientific outcome. Ruminants are the target species and there are no other less innervated/sentient species that could be a model for the ruminant diseases that are studied. See next paragraph for other refinement methods that are applied.

The classic method to prove protection of a new vaccine is efficacy in a vaccination-challenge test. However, if immunological correlates of protection (e.g. a serological response) can be used to prove efficacy this will be used rather than challenge infection. When an infection model has to be used, humane endpoints will be employed and staff will be fully trained to recognize animals that experience discomfort. Animals will be closely monitored and additional health checks are performed to ensure that no animal is left suffering.

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

For monitoring of the clinical health status of animals, all study animals will be checked at least once a day by a certified person. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

Furthermore efforts are made to optimally enrich the environment during containment.

## **Repetition and duplication**

### **E. Repetition**

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

The vaccines in the companys R&D program are unique and proprietary to the company. To show that vaccines are compatible (combined or associated use), a number of safety and efficacy studies done with the individual products has to be repeated with the vaccines administered together according to international regulations and guidelines.

## **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.

The animals are housed socially, but animals might have to be housed (temporarily) [REDACTED] in order to [REDACTED]

██████████. Some studies may require limited bedding during containment. In a few cases (██████████ model), it is necessary to use no bedding because of scientific reasons.

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

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

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

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Injections (for application of challenge material, injection with ██████████ drugs or agents) as well as sampling of blood are part of normal farm practice/veterinary care and will induce only mild discomfort. If the sampling is repeated (>5), the discomfort is considered to be moderate as a result of the stress when restrained and during handling of the animal.

All biotechnical procedures such as vaccination and blood sampling procedures have been described in Standard Operating Procedures (SOPs) (GLP accredited procedures).

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

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

Measurement of body temperatures and body weight, sampling urine, faeces, colostrum/milk, sampling on different mucosae ██████████ as well as ██████████ and pregnancy check are part of normal farm practice/veterinary care and will induce only mild discomfort.

If the following procedres ██████████ sampling or ██████████ brushes, punction ██████████, punction ██████████ biopsy) are repeated the discomfort is considered to be moderate.

All biotechnical procedures such as inoculation and sampling procedures have been described in Standard Operating Procedures (SOPs) and only well trained personnel will be responsible for the execution (GLP accredited procedures).

██████████ animals are more susceptible to disease and might therefore encounter discomfort related to intercurrent diseases. Transport of the animals to the testing facility might cause transient discomfort for the duration determination the protection against challenge infection of the transport, especially for animals that are transported ██████████.

The pathogenicity of the pathogen / safety profile of the vaccine candidate used in the infection studies is not yet determined. Therefore, it is possible that adverse events occur.

Depending on the nature of the pathogen / vaccine candidate the discomfort of the infection can range from mild in the absence of any clinical signs (e.g. ██████████) to moderate (e.g. ██████████ and severe (e.g. ██████████).

In case an infection model has to be developed for pathogens that do not cause clinical disease or only very mild disease, it might be necessary to ██████████. These procedures and any

effects related to the [REDACTED] treatment are already taken into consideration for the discomfort levels and durations listed above in the respective tables.

The clinical health status of all animals is checked at least once a day by qualified personnel. Special attention is paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

In consultation with the veterinarian and Study Director, if treatment does not interfere with the test results, it will be decided whether to apply adequate veterinary care including analgesia to alleviate treatment related pain (for example infection studies with [REDACTED] pathogens or [REDACTED] or pain not related to the treatment. In case of severe suffering, humane endpoints are applicable. General humane endpoints are described in an SOP (e.g. the condition of the animal prevents it from eating and drinking regularly, severe loss of body weight) and test specific humane endpoints are given in each study protocol if applicable.

Explain why these effects may emerge.

These procedures may be part of the experimental design. For vaccines intended for use in young animals, the study design may require that animals are vaccinated and / or infected at [REDACTED] or when only a [REDACTED]. In these cases, the young animals have to be [REDACTED] accordingly from the farm of birth to the testing facility.

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

All biotechnical procedures will only be performed according to standard procedures described in SOPs (GLP accredited procedures).

The number of samplings is reduced to a minimum number required to for a valid evaluation of results.

#### **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.

The severity of discomfort is depending on the nature of the pathogen (see 3.1 of the project proposal for specific clinical signs of the pathogens involved). However, the duration of severe discomfort will be limited due to the application of a humane endpoint if needed.

General humane endpoints are applicable to all animals, irrespectively of the type of experiment.

##### General Humane Endpoints:

- The animal experiences more than minor additional discomfort as a consequence of conditions resulting in long term or non-reversible inability to eat and or drink autonomously, fast or long lasting loss of weight, diseases or conditions that cause severe pain, suffering or discomfort such as bone fractions, force unnatural positioning and / or movements, open wounds or abscesses.
- Scientific endpoints: The target of the study reached / all planned samplings have been performed
- (Reliable and useful) results cannot be reached for reasons unrelated to the study

##### Specific humane endpoints after infection with bovine pathogens

- In general, disease specific clinical signs ([REDACTED]) do not normally lead to humane endpoints, but they may affect the general health of the animal (i.e. high fever, dullness, anorexia) leading to humane endpoints if
  - severe general clinical signs last for at least 2 days or the body temperature drops rapidly
  - the animal is unable to stand up and eat/drink actively for more than 1 day
- In the [REDACTED] are humane endpoints.

These test-specific humane endpoints are described in the corresponding study protocol. Each study protocol is reviewed by the AWB before execution of the study.

In case it is difficult to reach a decision based on the pre-defined criteria for an endpoint the designated veterinarian is empowered to decide that a humane endpoint is applied/reached.

Indicate the likely incidence.

Considering the expected number of studies with the different pathogens, the expected number of animals included in the different treatment groups (i.e. infected vs control group) and the expected

severity, at most 30 % of the animals is expected to have severe discomfort that would require euthanasia.

---

**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').

For the infection studies the type and severity of the clinical signs are depending on the type of disease. Similar to natural field infections they may cause mild to severe pain, distress, suffering or even impending death. See B for an overview of the different pathogens involved, the maximal discomfort caused by the disease and the maximum number of animals expected to reach the highest discomfort category.

---

**End of experiment**

---

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Postmortem investigation can be part of the experimental design to evaluate (histo)pathological lesions at different organ systems and or to attempt re-isolation of the inoculum from tissues and organs. In addition, animals with a pathogen cannot be returned to the farm of origin or transported to another farm to prevent the spread of disease. Therefore, all animals might have to be euthanized at the end of the study or when a humane endpoint is reached. Control animals that have not been infected may be reused or returned to the farm of origin or transported to another farm.

Moreover, return of the animals to commercial farms or slaughter for human consumption is often prohibited by the current legislation on use of antibiotics.

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.

X Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 22100
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. [REDACTED]
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure                             |
|---------------|--|
| 2             | Research: Vaccination challenge studies in ruminants |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

### 2 Description of animal procedures

#### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

During the research stage of a vaccine project, studies are carried out to estimate, whether the candidate vaccine is likely to successfully pass the safety and efficacy studies that are later on performed in the development phase.

The aim of this type of vaccination studies is to test if a vaccine candidate i) has acceptable safety characteristics and ii) is efficacious i.e. induces a measurable immune response and / or protects against one or more aspects of the disease caused by the pathogen(s) involved. To this end, animals are vaccinated according to the anticipated schedule and observed for local and systemic reaction after vaccination. The immune response after vaccination is determined. In the absence of a correlate of protection, the vaccinated animals or in case the vaccine is intended for the induction of passive protection, animals fed colostrum from vaccinated mothers will be infected with a challenge strain according to the previously established infection model (see [REDACTED]). Unvaccinated animals will also be included in the experiment as control to determine the efficacy of the experimental vaccine. After vaccination and after challenge infection, one or more of the following parameters will be evaluated:

- Clinical signs (e.g. changes in general health and or disease specific symptoms and local reactions)
- Body temperature (rectal temperature)
- Body weight
- Virus, bacterial or parasites shedding (swabbing of mucosal surfaces, sampling of faeces, urine, milk), viral/bacterial/parasitic load in [REDACTED] or other tissues [REDACTED]
- Viraemia, bacteraemia or parasitemia or haematological parameters (blood/[REDACTED] sampling)
- Post mortem examination (macroscopical and microscopical)

On the basis of the study results, it will be determined if a vaccine candidate has an acceptable risk-benefit



profile that is in line with criteria that have been laid down in EU directives, the Pharmacopoeia Europaea (Ph.Eur) and guidelines and regulations of the European Medicines Agency and other international regulatory bodies when applicable. Some fine-tuning of the composition (e.g. changes in antigens/adjuvant included) may be necessary before the optimal vaccine has been reached (proof of concept). In some cases it may not be possible to obtain proof of concept with the available candidates and knowledge of the pathogen, which means that the research project will be stopped.

During these orientating vaccination studies, it will also be attempted to find a serological correlate with protection or another surrogate immunological marker that will enable the drawing of conclusions on the efficacy of a candidate vaccine without challenge in further studies.

In case of [REDACTED] diseases, it might be necessary to mimic the [REDACTED] effect of [REDACTED] factors in order to reach the required sensitivity of the animals to the challenge infection with [REDACTED] pathogen.

In case a vaccine is intended for protection against transplacental infection, pregnant animals are challenged at one or more specified stage of pregnancy. The animals are then observed until the end of pregnancy to determine the outcome of the pregnancy and the health status of the offspring. Samples might have to be taken from the offspring to determine the presence of the challenge strain or specific pre-colostral antibodies. [REDACTED]

---

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

Four or more of the following procedures will be undertaken depending on the characteristics of the vaccine/ pathogen involved; the types of pathogens are described under B (in italics the frequency of the procedures):

1. Daily observation / scoring clinical signs including measurement of rectal temperature ( [REDACTED] )
2. Weighing [REDACTED]
3. Blood sampling [REDACTED] to determine [REDACTED] parameters and / or to determine the presence of the vaccine strain in the blood and / or to determine the presence of the challenge strain in the blood
4. Vaccine administration ( [REDACTED] )
5. Palpation of the injection site ( [REDACTED] )
6. [REDACTED] treatment by application of [REDACTED] drugs [REDACTED] and / or inoculation of [REDACTED]
7. Challenge administration [REDACTED]
8. Swabbing of (mucosal) surfaces [REDACTED] to determine the excretion of the vaccine and / or [REDACTED] ) to determine the excretion of the challenge strain
9. [REDACTED] to determine the presence of the challenge strain in the [REDACTED]
10. [REDACTED] to determine the presence of the challenge strain in the [REDACTED]
11. Urine, fecal, colostrum / milk samples [REDACTED] to determine the presence of the challenge strain
12. Punction of [REDACTED] or installation of a [REDACTED]
13. Punction [REDACTED]
14. [REDACTED] biopsy [REDACTED]
15. Pregnancy check [REDACTED]
16. Euthanasia

The duration of all procedures listed above will only be minutes at most. Typically, the length of the observation period after vaccination is [REDACTED] after each vaccination. If pregnant animals have to be followed until birth, the observation period will be longer, but in general, the total number of treatments does not increase.

The interval between vaccination and challenge infection or end of the study (in case of surrogate marker for protection) will be chosen in such a way that optimal protection is to be expected. The length of the observation period after challenge infection depends on the incubation period of the pathogen, but is

generally 1 to 4 weeks. To rule out that clinical signs are caused by an unintended co-infection, non-infected control animals may be included in a study. In addition, in models for neonatal disease in sheep and goats, ewes/goats may be required to give birth to and foster the lambs / kids but these will not be infected.

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

For new untested vaccine candidates it needs to be proven that they fulfil the required efficacy and safety criteria. Therefore, in initial studies small numbers of animals will be used that may not be sufficient to demonstrate statistically significant differences between treatment groups. However, with such studies it will be possible to gain an estimate of the variance between individual responses of the animals in a group at these particular observation points. This information will enable calculations to identify the minimum numbers of animals needed in the groups to give sufficient likelihood of obtaining a statistically significant result by which it can be judged that the treatments have had a real effect. In particular, the variance in the groups together with the magnitude of effect will be used in power calculations to achieve 80% power at the 95% confidence level (regarded by regulatory authorities as the standard by which such experiments should be designed).

## **B. The animals**

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

Studies will be performed in cattle, sheep and / or goats as appropriate. Animals of both sexes can be used for this type of animal experiment unless the study has to be performed in pregnant and / or lactating animals.

Purchase of animals: The animals will be purchased from commercial suppliers, obtained from affiliated farms or bred at [REDACTED] facilities.

If a certain microbial status is required, animals will be purchased from farms with the respective (certified) microbiological status and / or screened prior to inclusion in the study.

If the study design requires that the animals are vaccinated and / or infected at the [REDACTED] or when only [REDACTED] the young animals have to be [REDACTED] accordingly from the farm of birth to the testing facility.

### Special requirements

If young animals with a specific [REDACTED] status are required, it is often necessary to warrant that [REDACTED]. As these [REDACTED] animals are more susceptible for intercurrent infections, they receive [REDACTED] treatment. With the exception of studies against [REDACTED] pathogens, [REDACTED] can be given to the animals from 2 days after birth onwards as an aid in the prevention of [REDACTED]

### Age of animals:

Age of the animals for vaccine research varies from a few hours old to adult. The age of the animals to

be used should be the minimal age recommended for use of the vaccine.

If very young lambs or kids have to be vaccinated, it might be necessary to include the ewes / goats to foster the lambs / kids. For vaccines intended to be used for pregnant / lactating animals, it may be necessary to include dams in one or more specific trimester of pregnancy, depending on the vaccination schedule to be recommended. Samples might have to be taken from the offspring, for certain studies, euthanasia of the offspring might be required.

The tables below, specify, which models would be used for the different pathogens that might be included in research projects over the next 5 years. The lists are more extensive than the actual portfolio will be, but it is not possible at this moment to predict, which pathogens will be worked on.

The animal categories listed are the age groups considered to be most sensitive and therefore have to be used to perform the basic efficacy studies.

Priorities within the R&D portfolio are based on market needs and the estimated likelihood of success of obtaining a vaccine candidate that fulfills the required product profile. Priorities can shift upon identification of new unmet needs in the field. For example, if a new [REDACTED] pathogen with substantial impact on the ruminant industry is discovered, this will be given priority over research into a second generation improved product for a [REDACTED] pathogen.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
New pathogen	Cattle <6 Months old	Severe (max 70%) <sup>1</sup>	Max 2 wk

<sup>1</sup>: Studies with potential new pathogens are given the highest expected discomfort score until the severity of clinical signs has been established

[REDACTED]

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 2 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 2 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 50%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
New pathogen	Cattle <6 Months old	Moderate (max 100%) <sup>2</sup>	Max 2 wk

<sup>1</sup>Vaccines are given to [REDACTED] in order to induce [REDACTED]. This part of the study does only cause mild discomfort. The information given in the table above relates to the discomfort during challenge studies in calves in [REDACTED] will be determined.

<sup>2</sup>: Studies with potential new pathogens are given the highest expected discomfort score until the severity of clinical signs has been established

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
[REDACTED]	Adult cows	Moderate (max 50%)	Max 2 wk
[REDACTED]	Adult cows	Moderate (max 50%)	Max 2 wk
[REDACTED]	Adult cows	Mild	Max 2 wk
[REDACTED]	Adult cows	Mild	Max 2 wk
[REDACTED]	Adult ewes	Mild	Max 2 wk
[REDACTED]	Adult ewes	Mild	Max 2 wk
New pathogen	Adult cows	Moderate (max 100%) <sup>1</sup>	Max 2 wk
New pathogen	Adult ewes	Moderate (max 100%) <sup>1</sup>	Max 2 wk

<sup>1</sup>: Studies with potential new pathogens are given the highest expected discomfort score until the severity of clinical signs has been established

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
[REDACTED]	Adult cows	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
[REDACTED]	Adult cows	Severe (max 50%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Adult cows	Severe (max 50%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Adult cows	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
[REDACTED]	Adult cows	Severe (max 50%)	Max 1 wk
New pathogen	Adult cows	Severe (max 100%) <sup>1</sup>	Max 2 wk





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.

##### Replacement:

In accordance with international regulations, animals of the target species must be used to demonstrate the safety and efficacy of a vaccine because there are no suitable alternatives or models for the induction of immunity in a whole organism or for the infection of living tissues as complex as those found in the whole animal in which the vaccines are intended to have efficacy. Therefore, during the research phase, candidate vaccines have to be tested in the same models.

Reduction: All studies are performed with the lowest possible number of animals that are required to enable meaningful interpretation of the results. This will be achieved through an ongoing evaluation of the observations in each study. The number of animals per study will be substantiated in each study protocol. According to internal procedures, the study protocol will be reviewed by the Animal Welfare Body and a statistician.

##### Refinement:

Where possible it is pursued to refine the routes of administration of substances and sampling techniques to improve animal welfare/to reduce discomfort of administration, but without endangering the scientific outcome. Ruminants are the target species and there are no other less innervated/sentient species that could be a model for the ruminant diseases that are studied. See next paragraph for other refinement methods that are applied.

The classic method to prove protection of a new vaccine is efficacy in a vaccination-challenge test. However, if immunological correlates of protection (e.g. a serological response) can be used to prove efficacy this will be used rather than challenge infection. When an infection model has to be used, humane endpoints will be employed and staff will be fully trained to recognize animals that experience discomfort. Animals will be closely monitored and additional health checks are performed to ensure that no animal is left suffering.

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

For monitoring of the clinical health status of animals, all study animals will be checked at least once a day by a certified person. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

Furthermore efforts are made to optimally enrich the environment during containment.

### **Repetition and duplication**

#### **E. Repetition**

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

The vaccines in the company's R&D program are unique and proprietary to the company. To show that vaccines are compatible (combined or associated use), a number of the safety and efficacy studies done with the individual products has to be repeated with the vaccines administered together according to international regulations and guidelines.

### **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

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

The animals are housed socially, but animals might have to be housed (temporarily) individually without physical contact (but in the same holding room) in order to prevent unintended spreading of the vaccine strain or field infection. Some studies may require limited bedding during containment. In a few cases [REDACTED] it is necessary to use no bedding because of scientific reasons.

#### **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, 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.

Vaccination, injections (for application of challenge material, injection with [REDACTED] drugs or agents) as well as sampling of blood-are part of normal farm practice/veterinary care and will induce only mild discomfort. If the sampling is repeated [REDACTED], the discomfort is considered to be moderate as a result of the stress when restrained and during handling of the animal.

All biotechnical procedures such as vaccination and blood sampling procedures have been described in Standard Operating Procedures (SOPs) and only well trained personnel will be responsible for the execution (GLP accredited procedures).

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

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

Measurement of body temperatures and body weight, sampling urine, faeces, colostrum/milk, sampling on different mucosae [REDACTED] as well as [REDACTED] are part of normal farm practice/veterinary care and will induce only mild discomfort. **If the following procedures [REDACTED] [REDACTED] sampling or [REDACTED], puncture of [REDACTED] puncture [REDACTED] [REDACTED] biopsy) are repeated the discomfort is considered to be moderate.**

All biotechnical procedures such as vaccination and sampling procedures have been described in Standard Operating Procedures (SOPs) and only well trained personnel will be responsible for the execution (GLP accredited procedures).

Colostrum deprived animals are more susceptible to disease and might therefore encounter discomfort related to intercurrent diseases. Transport of the animals to the testing facility might cause transient discomfort for the duration of the transport, especially for animals that are transported below the age of 10 days.

Vaccination can cause a transient increase in rectal temperature, sometimes accompanied with a reduced level of activity, and a transient vaccination site reaction. Systemic reactions generally disappear within 24 hours, but local reactions (that are generally painless) can persist for several days and even weeks. The safety and efficacy profile of the vaccine compositions used in the research phase is not yet



determined. Therefore, it is possible that adverse events occur or that protection of the vaccinated animals is very limited.

Depending on the nature of the challenge inoculum the discomfort of the challenge can range from mild in the absence of any clinical signs (e.g. [REDACTED]) to moderate (e.g. [REDACTED] -) and severe (e.g. [REDACTED]). Vaccination will result in a significant reduction of clinical abnormalities after challenge compared to the unvaccinated control group and thus to a reduction of animals with discomfort.

In case of challenge studies with pathogens that do not cause clinical disease or only very mild disease, it might be necessary to [REDACTED] the animals. These procedures and any effects related to the [REDACTED] treatment are already taken into consideration for the discomfort levels and durations listed above in the respective tables.

The clinical health status of all animals is checked at least once a day by qualified personnel. Special attention is paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

In consultation with the veterinarian and Study Director, if treatment does not interfere with the test results, it will be decided whether to apply adequate veterinary care including analgesia to alleviate treatment related pain (for example infection studies with [REDACTED] or [REDACTED] or pain not related to the treatment. In case of severe suffering, humane endpoints are applicable. General humane endpoints are described in an SOP (e.g. the condition of the animal prevents it from eating and drinking regularly, severe loss of body weight) and test specific humane endpoints are given in each study protocol if applicable.

---

Explain why these effects may emerge.

These procedures may be part of the experimental design. For vaccines intended for use in young animals, the study design may require that the animals are vaccinated and / or infected [REDACTED] or when only [REDACTED]. In these cases, the young animals have to be [REDACTED] accordingly from the farm of birth to the testing facility.

---

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

All biotechnical procedures will only be performed according to standard procedures described in SOPs (GLP accredited procedures).

The number of samplings will be done in accordance with the respective guidelines or if no requirements are given, the number of samplings is reduced to a minimum number required to for a valid evaluation of results.

---

## **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.

To determine the efficacy of a vaccine it is necessary to challenge animals with the pathogenic organism. The severity of discomfort is depending on the nature of the pathogen (see 3.1 of the project proposal for specific clinical signs of the pathogens involved). However, the duration of severe discomfort will be limited due to the application of a humane endpoint if needed.

*General humane endpoints are applicable to all animals, irrespectively of the type of experiment.*

*General Humane Endpoints:*

- The animal experiences more than minor additional discomfort as a consequence of conditions resulting in long term or non-reversible inability to eat and or drink autonomously, fast or long lasting loss of weight, diseases or conditions that cause severe pain, suffering or discomfort such as bone fractions, force unnatural positioning and / or movements, open wounds or absesses.
- Scientific endpoints: The target of the study reached / all planned samplings have been performed
- (Reliable and useful) results cannot be reached for reasons unrelated to the study

*Specific humane endpoints after infection with bovine pathogens*

- In general, disease specific clinical signs (for example [REDACTED] or [REDACTED]) do not normally lead to humane endpoints, but they may affect the general health of the animal (i.e.

high fever, dullness, anorexia) leading to humane endpoints if

- severe general clinical signs last for at least 2 days or the body temperature drops rapidly
- the animal is unable to stand up and eat/dring actively for more than 1 day

- In [REDACTED] are humane endpoints.

These test-specific humane endpoints need to be described in the corresponding study protocol. Each study protocol is reviewed by the AWB before execution of the study.

In case it is difficult to reach a decision based on the pre-defined criteria for an endpoint the designated veterinarian is empowered to decide that a humane endpoint is applied/reached.

Indicate the likely incidence.

Considering the expected number of studies with the different pathogens, the expected number of animals included in the different treatment groups (i.e. vaccinated / infected / control group) and the expected severity, at most 20 % of the animals is expected to have severe discomfort that would require euthanasia.

#### **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').

For studies without challenge, discomfort will be mild to moderate depending on the number of sampling points. For vaccination-challenge studies, the type and severity of the clinical signs are depending on the type of challenge infection. Similar to natural field infections they may cause mild to severe pain, distress, suffering or even impending death. See B for an overview of the different pathogens involved, the maximal discomfort caused by the disease and the maximum number of animals expected to reach the highest discomfort category. Vaccination is expected to reduce the level of discomfort after challenge, but the non-vaccinated control group will experience the symptoms of the natural infection.

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Postmortem investigation can be part of the experimental design to evaluate (histo)pathological lesions at the injection sites and or to evaluate effect of the infection on different organ systems and or to attempt re-isolation of the inoculum from tissues and organs.

In addition, animals vaccinated with a non-licensed vaccine or infected with a pathogen cannot be returned to the farm of origin or transported to another farm to prevent the spread of disease.

Therefore, all animals might have to be euthanized at the end of the study or when a humane endpoint is reached. Control animals that have not been vaccinated and infected may be reused or returned to the farm of origin or transported to another farm. In case of a surrogate immunological marker (no challenge), animals housed on contract farms can remain on the farm or transported to other farms until the end of their natural/economic life.

Moreover, return of the animals to commercial farms or slaughter for human consumption is often prohibited by the current legislation on use of antibiotics.

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.

X Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 22100
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. [REDACTED]
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure                                    |
|---------------|---|
| 3             | Research: Assay development and preparation of biomaterials |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The potency of each inactivated vaccine batch used in development studies has to be determined to set the limits for release and to determine the stability. Traditionally, the potency of inactivated vaccines, is measured in a so-called *in vivo* potency in [REDACTED]. During the research phase of a vaccine project, the test protocol for the potency test is determined. In an initial study, the strength of the immune response is compared between the different animal species. In further studies, it is investigated, whether the antibody response is dose dependent and the release criteria are determined.

Apart from the replacement of experimental animals, *in vitro* potency tests are very much preferred over *in vivo* testing for multiple other reasons including costs and timelines. However, for several inactivated vaccines, *in vivo* potency tests are still necessary because it is either not possible to determine the antigen and/or adjuvant content *in vitro* or an *in vivo* batch test is mandatory under the respective legislation (e.g. Ph.Eur monograph.).

In such a batch potency test, animals are injected with one or more doses of the vaccine batch. The potency is preferably determined by measuring the antibody response. In a few cases, determination the protection against challenge infection is mandatory or necessary for scientific / technical reasons. Biomaterials such as specific antisera or monoclonal antibodies are needed in most vaccine projects for different purposes such as the identification, characterisation and quantification of the vaccine strain, neutralizing the vaccine virus, setting up *in vitro* tests et cetera.

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

Two or more of the following treatments will be employed in order to fulfil the requirements for the potency studies as laid down in the Ph Eur (*in italics the frequency of the treatments*). The same

treatments are also applied for the preparation of biomaterials:

1. Blood sampling [REDACTED] to determine [REDACTED]

2. Test substance administration [REDACTED]

[REDACTED]

3. Weighing [REDACTED]

4. Euthanasia

The duration of these procedures will only be minutes.

In case of potency tests that involve challenge infection, the following additional treatments are employed

5. Administration of challenge material [REDACTED]

[REDACTED]

6. Clinical observation ([REDACTED] daily for up to [REDACTED] days)

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

The group sizes for potency tests that are specified in guidelines typically range between 5 and 10. For those models that are not described in specific regulations, a group size of 5-10 animals is generally accepted by regulatory authorities. If sufficient knowledge on the variation is available the group size will be calculated such that a statistically significant difference between standard and substandard vaccine batches can be made with 80% power and 95% confidence.

For the preparation of antisera the minimal number of animals that will provide the required volume will be used.

For [REDACTED] mice will be used per antigen.

## **B. The animals**

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

For some vaccines, the species to be used for a batch potency test is prescribed in a Ph.Eur monograph. In general, [REDACTED] are preferred over the ruminant target species because they are more genetically homogeneous and better microbiologically controlled.

Therefore, less variance in response and better reproducibility can be achieved, which means that the number of experimental animals can be lower than when using ruminants.

For some vaccines, the type of laboratory animals to be used for a batch potency test is prescribed in a Ph.Eur monograph.

Preparation of antisera in non-ruminant animals or murine monoclonal antibodies has the advantage, that these animals are free of antibodies against other ruminant pathogens.

Based on the experience over the last 5 years and the current R&D program and priorities, the total expected number of laboratory animals is the following:

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] of both sexes will be used, but for [REDACTED] only females will be included in studies because of a higher risk of fighting in male animals and the relatively long time that the animals are in an experiment. With regard to the length of these experiments ([REDACTED]) it is not acceptable to use males, because they would need to be single housed.

Welfare concerns are the basis for the preferred use of female [REDACTED] because they hardly fight. Data from recently executed experiments with male animals have shown that in half of the experiments there was a loss of animals because of severe fighting. This has resulted in the repetition of these experiments and therefore in the use of more animals. A loss of animals due to fighting has never occurred when female animals were used. We consider the aggression and fighting a worrying impairment of welfare. Moreover, the aggression will cause stress, which is known to have effects on the immune system.

In addition, use of animals of both sexes would increase the variability and thereby increase the number of animals needed.

In these studies the functioning of the immune system is crucial and variation in the immune response

caused by external factors should be avoided as much as possible.

Origin [REDACTED]

All animals are supplied by certified vendors accompanied by a health certificate according to FELASA recommendations. All purchased animals have a SPF status.

Origin [REDACTED]

Own SPF [REDACTED] breeding unit or commercial vendor.

Age of animals:

The required species and age (or weight) is usually designated as the most sensitive species or age for the test component in question. If such specific knowledge is not available the most practical choices are made, based on possibilities for purchase and housing conditions. Moreover, animals must be immunologically fit to be subjected to immunizations and blood samplings.

---

### 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.

Replacement:

Apart from the replacement of experimental animals, *in vitro* potency tests are very much preferred over *in vivo* testing for multiple other reasons including costs and timelines. Therefore, multidisciplinary teams are active at the company to replace *in vivo* potency tests by *in vitro* tests such as antigenic mass assays for the potency testing of vaccines.

Reduction: The animal species that is expected to give the most discriminatory test with the smallest number of animals will be used. The number of animals per study will be substantiated in each study protocol. Each study protocol will be reviewed by the Animal Welfare Body and a statistician.

Refinement: Following the codes of practice for immunization is the basis for refinement in these animal procedures. Where possible it is pursued to refine the routes of administration of substances and sampling techniques to improve, but without endangering the scientific outcome. For example; blood sampling in rodents is done under anesthesia. See next paragraph for other refinement methods that are applied.

Where ever possible, potency testing will be based on the testing of antibodies or other correlates of protection rather than by challenge.

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

Following the code of practice for immunization and the code of practice for monitoring the welfare of the animals is the basis for refinement in these animal procedures.

In general animals are always housed socially, but animals might have to be (temporarily) separated due to fighting or because of veterinary concerns. Furthermore, to enhance animal welfare, species specific environmental enrichment is provided to all animals.

---

For monitoring of the clinical health status of animals, all study animals will be checked at least once a day by a certified person. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

## 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.

A potency test model needs to be developed for a specific vaccine. Experiences from vaccines with similar composition can be used, but eventually, the model has to be validated for the specific vaccine. Specific biomaterials have to be available for each project. Prior to the preparation of new biomaterials, the scientific literature and the company database for biomaterials available at the different research sites will be consulted in order to prevent unnecessary preparation of new biomaterials.

## 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

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

Some studies may require limited bedding during containment.

### 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, analgesia or other pain relieving methods be used?

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

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

Injections (vaccination, inoculation of challenge material) and blood sampling are part of normal veterinary care / commonly used biotechnical procedures and will induce only mild discomfort or moderate discomfort of very short duration.

Anesthesia will be applied during blood sampling of [REDACTED]. Anesthesia will not be applied during sampling blood from [REDACTED]. In these species blood sampling causes only

mild discomfort or moderate discomfort of very short duration. Applying anesthesia would only increase discomfort as the animal needs to be restrained during administration.

For each species blood sampling and other biotechnical procedures have been described in Standard Operating Procedures (SOPs) (GLP accredited procedures).

As the vaccines to be tested have already been found to be safe in the target species (ruminants) it is very unlikely that they will cause adverse effects in non-target animals.

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

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

In general, biotechnological procedures such as weighing and sampling may result in discomfort, because animals need to be fixated and especially if performed repeatedly.

Moreover, application of the vaccine can result in a transient increase in rectal temperature, sometimes accompanied with a reduced level of activity, and a transient vaccination site reaction. Systemic reactions will generally disappear within 24 hours, but local reactions (swelling redness), that are generally painless, can persist for several days and even weeks, but these local reactions do not affect normal behaviour (activity, feeding and drinking).

Depending on the nature of the challenge inoculum, the discomfort of the challenge can range from mild in the absence of any clinical signs ( ) to moderate ( ) and severe ( ).

Vaccination will result in a significant reduction of clinical abnormalities after challenge compared to the unvaccinated control group.

For monitoring of the clinical health status of animals, all study animals will be checked at least once a day by a certified person. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

In case animals experience discomfort (whether or not related to the treatment), it will be decided in consultation with the veterinarian and Study Director whether to apply adequate veterinary care to alleviate unexpected pain and/or distress (if treatment does not interfere with the test results). In case of severe suffering, humane endpoints are applicable. General humane endpoints are described in an SOP (e.g. the condition of the animal prevents it from eating and drinking regularly, severe loss of body weight) and test specific humane endpoints are given in each study protocol if applicable.

Explain why these effects may emerge.

These procedures and if applicable the clinical signs caused by the challenge may be part of the experimental design.

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

Weighing is part of normal veterinary care and will induce only mild discomfort. Taking samples of mucosal surfaces or urine will result in mild discomfort, with the exception of repeated mucosal swabbing, which is considered to be moderate discomfort. Biotechnical procedures have been described in SOPs (GLP accredited procedures). Unless required by the applicable regulations or scientific reasons, potency testing will be based on the testing of correlates of protection such as antibody levels rather than by challenge.

### **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 potency tests that require challenge with a pathogenic organism, the severity of discomfort is depending on the nature of the pathogen. However, the duration of severe discomfort will be limited due to the application of a humane endpoint if needed.

General humane endpoints are applicable to all animals, irrespectively of the type of experiment.

#### General Humane Endpoints:

- The animal experiences more than minor additional discomfort as a consequence of conditions resulting in long term or non-reversible inability to eat and or drink autonomously, fast or long lasting loss of weight, diseases or conditions that cause severe pain, suffering or discomfort such

- as bone fractions, force unnatural positioning and / or movements, open wounds or abscesses.
- Scientific endpoints: The target of the study reached / all planned samplings have been performed
- (Reliable and useful) results cannot be reached for reasons unrelated to the study

Specific humane endpoints after infection with bovine pathogens

- In general, disease specific clinical signs ( [REDACTED] ) do not normally lead to humane endpoints, but they may affect the general health of the animal (i.e. high fever, dullness, anorexia) leading to humane endpoints if
  - severe general clinical signs last for at least 2 days or the body temperature drops rapidly
  - the animal is unable to stand up and eat/dring actively for more than 1 day

These test-specific humane endpoints are described in the corresponding study protocol. Each study protocol is reviewed by the AWB before execution of the study.

In case it is difficult to reach a decision based on the pre-defined criteria for an endpoint the designated veterinarian is empowered to decide that a humane endpoint is applied/reached.

Indicate the likely incidence.

As the overall majority of potency tests as well as the preparation of biomaterials do not require challenge, the incidence of severe discomfort requiring euthanasia is estimated to be less than 2 %.

**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').

Discomfort will be mild ( $\geq 75\%$ ) to moderate ( $\leq 25\%$ ) depending on the number of sampling points, type of biotechnical procedure and whether the challenge infection causes disease in the model animal.

**End of experiment**

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

For some potency models it is necessary to investigate the presence of (histo)pathological lesions and take organ and tissue samples for re-isolation of the vaccine strain.

For the preparation of [REDACTED] it is necessary to kill the animals in order to obtain the required volumes. For preparation of [REDACTED]

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.

X Yes



Geachte CCD,

Bijgevoegd zijn de antwoorden op gestelde vragen vanuit CCD n.a.v. brief 6 juni 2017.

Uw referentie is: Aanvraagnummer AVD2210020171629 (Research on new ruminant vaccines) [REDACTED]

In paars zijn de antwoorden weergegeven. Naar aanleiding van deze vragen zijn ook de documenten Bijlagen beschrijving dierproeven aangepast. Ook hierin zijn de aanpassingen met paarse tekst weergegeven.

We hopen u hiermee voldoende geïnformeerd te hebben. Indien er nog vragen zijn, dan vernemen wij deze graag.

Met vriendelijke groeten,

[REDACTED] [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

---

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

[REDACTED],  
In aanvulling op de eerder gestelde vragen, hebben wij nog enkele vragen over aanvragen AVD2210020171629 en [REDACTED].

[REDACTED] *dieren:*

In Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 van aanvraag AVD2210020171629 en in Bijlage Dierproeven

[REDACTED] worden ook [REDACTED] dieren en [REDACTED] genoemd. In de Wet op de dierproeven staat dat deze wet ook van toepassing is op [REDACTED] van zoogdieren [REDACTED]

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
te ondervinden.

Zijn de [REDACTED] dieren meegenomen in de [REDACTED]  
Kunt u een inschatting maken om hoeveel [REDACTED] het zal gaan, per Bijlage Dierproeven? Is hierbij ook rekening gehouden met het ongerief van de ongebooren dieren?

Indien de [REDACTED] dieren niet meegenomen zijn in de aantallen, kunt u dan nieuwe Bijlagen Dierproeven sturen, waarin deze aantallen zijn verwerkt? Anders kunt u de overige vragen (aantal dieren en ongerief) beantwoorden zonder nieuwe Bijlagen Dierproeven. –

**De aantallen en het ongerief waren al meegenomen, echter stonden de [REDACTED] dieren als "cattle / sheep <6 maanden" vernoemd bij de [REDACTED] modellen. Dit is in de nieuwe Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 van aanvraag AVD2210020171629 [REDACTED] aangepast. De betreffende aantallen zijn nu in de regel [REDACTED] weergegeven.**





## Appendix Description animal procedures

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

### 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	22100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	[REDACTED]	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		1	Research: Infection studies in ruminants

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

### 2 Description of animal procedures

#### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Infection studies will be performed for one of the three different reasons:

- 1) To determine the pathogenicity of new pathogens (to prove Koch's postulates), variants of known pathogens, should they appear or the role of specific genes in the pathogenicity and interaction with the host's immune system.
- 2) To develop an infection model that will be used in vaccination-infection studies to assess the efficacy of vaccine candidates (see Addendum 2).
- 3) To assess the safety profile of a live attenuated vaccine candidate obtained by "classical" means (e.g. in vitro passage or chemical mutagenesis) or gene-modification (including vector vaccines).

In general, the application of a pathogen will be done via the natural route of infection, but if the natural route does not induce all presentations of a disease under laboratory conditions, it might be necessary to use another route (e.g. parenteral injection to induce a systemic infection).

Application of a potential vaccine candidate will typically be done by the route intended as application route of the future product, but in specific cases it might be necessary to follow the route that gives highest risk of adverse events in order to make a meaningful assessment of the safety profile.

In case a pathogen or vaccine candidate might cause transplacental infection, pregnant animals at one or more specified stage of pregnancy have to be used in the infection studies. The animals are then observed until the end of pregnancy to determine the outcome of the pregnancy and the health status of the offspring. Samples might have to be taken from the offspring to determine the presence of the pathogen / vaccine candidate or specific pre-colostral antibodies. [REDACTED]

After inoculation of the vaccine candidate or pathogen, one or more of the following parameters will be

evaluated:

- Clinical signs (e.g. changes in general health and or disease specific symptoms and local reactions)
- Body temperature (rectal temperature)
- Body weight
- Virus, bacterial or parasites shedding [redacted] mucosal surfaces, sampling of faeces, urine, milk), [redacted]
- Viraemia, bacteraemia or parasitemia or haematological parameters (blood/ [redacted] )
- Post mortem examination (macroscopical and microscopical)

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

Four or more of the following procedures will be undertaken depending on the characteristics of the vaccine/ pathogen involved; the types of pathogens are described under B (in italics the frequency of the procedures):

1. Daily observation / scoring clinical signs including measurement of rectal temperature ([redacted])
2. Weighing [redacted]
3. Blood sampling [redacted] to determine [redacted] parameters and / or to determine the presence of the pathogen or vaccine candidate in the blood
4. [redacted] treatment by application of [redacted] and / or inoculation of [redacted]
5. Administration of pathogen or vaccine candidate [redacted]
6. Swabbing of (mucosal) surfaces [redacted] to determine the excretion of the pathogen or vaccine candidate
7. [redacted] to determine the presence of the pathogen or vaccine candidate in [redacted]
8. [redacted] to determine the presence of the pathogen or vaccine candidate in the [redacted]
9. Urine, fecal, colostrum / milk samples [redacted] to determine the presence of the pathogen or vaccine candidate
10. Punction of [redacted] or installation of a [redacted]
11. Punction [redacted]
12. [redacted] biopsy [redacted]
13. Pregnancy check [redacted]
14. Euthanasia

The duration of all procedures listed above will only be minutes at most. Typically, the length of the observation period after infection is [redacted]. If pregnant animals have to be followed until birth, the observation period will be longer, but in general, the total number of treatments does not increase. To rule out that clinical signs are caused by an unintended co-infection, non-infected control animals may be included in a study. In addition, in models for neonatal disease in sheep and goats, ewes/goats may be required to give birth to and foster the lambs / kids but these will not be infected.

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

In this type of initial studies, it is not obligatory to demonstrate statistically significant differences between treatment groups. However, these studies will enable an estimation of the variance between individual responses of the animals in a group at these particular observation points. Based on this information the minimum numbers of animals per group needed to demonstrate the efficacy of a vaccine during the development phase can be estimated. In this type of experiments, the group size is in general 5-8 animals, depending on the expected variation in the infection model. This group size is in line with the group size for infection studies as specified in most European Pharmacopoeia monographs on ruminant vaccines.

## **B. The animals**

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

Studies will be performed in cattle, sheep and / or goats as appropriate. Animals of both sexes can be used for this type of animal experiment unless the study has to be performed in pregnant and / or lactating animals.

Purchase of animals: The animals will be purchased from commercial suppliers, obtained from affiliated farms or bred at [REDACTED] facilities.

If a certain microbial status is required, animals will be purchased from farms with the respective (certified) microbiological status and / or screened prior to inclusion in the study.

If the study design requires that animals are vaccinated and / or infected at [REDACTED] or when only a [REDACTED], the young animals have to be [REDACTED] accordingly from the farms of birth to the testing facility.

### Special requirements

If young animals with a specific antibody status are required, it is often necessary to warrant that [REDACTED]. As these [REDACTED] animals are more susceptible for intercurrent infections, they receive [REDACTED]. With the exception of studies against [REDACTED] pathogens, colostrum can be given to the animals from 2 days after birth onwards as an aid in the prevention of [REDACTED]

### Age of animals:

Age of the animals for vaccine research varies from a few hours old to adult. The age of the animals to be used should be the age at which clinical disease is expected or the minimal age recommended for use of the vaccine.

If the infection has to be done in very young lambs or kids, it might be necessary to include the ewes / goats to foster the lambs / kids. In order to study transplacental spread of the pathogen or vaccine

candidate it may be necessary to include dams in one or more specific trimester of pregnancy. Samples might have to been taken from the offspring, for certain studies, euthanasia of the offspring might be required.

The tables below specify which models would be used for the different pathogens that might be included in infection studies during the research projects over the next 5 years. The lists are more extensive than the actual portfolio will be, but it is not possible at this moment to predict exactly which pathogens will be worked on.

The animal categories listed are the age groups considered to be most sensitive and therefore have to be used to perform the basic efficacy and safety studies.

Priorities within the R&D portfolio are based on market needs and the estimated likelihood of success of obtaining a vaccine candidate that fulfills the required product profile. Priorities can shift upon identification of new unmet needs in the field. For example, if a new [REDACTED] pathogen with substantial impact on the ruminant industry is discovered, this will be given priority over research into a second generation improved product for a [REDACTED] pathogen.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
New pathogen	Cattle <6 Months old	Severe (max 70%) <sup>1</sup>	Max 2 wk

<sup>1</sup>: Studies with potential new pathogens are given the highest expected discomfort score until the severity of clinical signs has been established

[REDACTED]

[REDACTED]

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
██████████	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 2 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 2 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Severe (max 50%)	Max ± 2 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
New pathogen	Cattle <6 Months old	Moderate (max 100%) <sup>2</sup>	Max 2 wk

<sup>1</sup>Vaccines are given to ██████████ in order to ██████████. This part of the study does only cause mild discomfort. The information given in the table above relates to the discomfort during challenge studies ██████████ will be determined.

<sup>2</sup>: Studies with potential new pathogens are given the highest expected discomfort score until the severity of clinical signs has been established

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
██████████	Adult cows	Moderate (max 50%)	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Moderate (max 50%)	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Mild	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Mild	Max 2 wk
██████████	Adult ewes	Mild	Max 2 wk
██████████	Adult ewes	Mild	Max 2 wk
New pathogen	Adult cows	Moderate (max 100%) <sup>1</sup>	Max 2 wk
New pathogen	Adult ewes	Moderate (max 100%) <sup>1</sup>	Max 2 wk

<sup>1</sup>: Studies with potential new pathogens are given the highest expected discomfort score until the severity of clinical signs has been established

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
██████████	Adult cows	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Severe (max 50%)	Max 1 wk
██████████	Adult cows	Severe (max 50%)	Max 1 wk
██████████	Adult cows	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Severe (max 50%)	Max 1 wk
New pathogen	Adult cows	Severe (max 100%) <sup>1</sup>	Max 1 wk





	Moderate	■	■
	Severe	■	■
Sheep	Mild	■	■
	Moderate	■	■
	Severe	■	■
Goat	Mild	■	■
	Moderate	■	■
	Severe	■	■

\*: Discomfort due to disease

\*\* : Including [REDACTED]

\*\*\*: Due to repeated procedures the overall discomfort will be moderate in at most 50% of the animals  
 ([REDACTED] [REDACTED])

In the infection studies, one or more groups are compared to an uninfected control group. The group size is dependent on the disease model. In general, the group size used will be [REDACTED] but could be larger depending on the expected variation in the infection model. The expected numbers per category of vaccine are:

Per Model	Cattle <6Months	Adult cattle	Sheep <6Months	Adult sheep	Goat <6Months	Adult goat
[REDACTED]	■	■	■	■	■	■
[REDACTED]	■	■	■	■	■	■
[REDACTED]	■	■	■	■	■	■
[REDACTED]	■	■	■	■	■	■
[REDACTED]	■	■	■	■	■	■
[REDACTED]	■	■	■	■	■	■
[REDACTED]	■	■	■	■	■	■
[REDACTED]	■	■	■	■	■	■
[REDACTED]	■	■	■	■	■	■

**C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

Re-use might be considered for animals that experience only minor discomfort during the first study, for example uninfected control animals. This approach is considered acceptable especially in case of animals that were raised under special conditions (e.g. [REDACTED]) to achieve a certain [REDACTED] status

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

xNo

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.

**Replacement:**

In accordance with international regulations, animals of the target species must be used to demonstrate the safety and efficacy of a vaccine because there are no suitable alternatives or models for the induction of immunity in a whole organism or for the infection of living tissues as complex as those found in the whole animal in which the vaccines are intended to have efficacy. Therefore, during the research phase, infection models have to be developed in the target animals-and candidate vaccines have to be tested in the same models.

**Reduction:** All studies are performed with the lowest possible number of animals that are required to enable meaningful interpretation of the results. This will be achieved through an ongoing evaluation of the observations in each study. The number of animals per study will be substantiated in each study protocol. According to internal procedures, the study protocol will be reviewed by the Animal Welfare Body and a statistician.

**Refinement:**

Where possible it is pursued to refine the routes of administration of substances and sampling techniques to improve animal welfare/to reduce discomfort of administration, but without endangering the scientific outcome. Ruminants are the target species and there are no other less innervated/sentient species that could be a model for the ruminant diseases that are studied. See next paragraph for other refinement methods that are applied.

The classic method to prove protection of a new vaccine is efficacy in a vaccination-challenge test. However, if immunological correlates of protection (e.g. a serological response) can be used to prove efficacy this will be used rather than challenge infection. When an infection model has to be used, humane endpoints will be employed and staff will be fully trained to recognize animals that experience discomfort. Animals will be closely monitored and additional health checks are performed to ensure that no animal is left suffering.

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

For monitoring of the clinical health status of animals, all study animals will be checked at least once a day by a certified person. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

Furthermore efforts are made to optimally enrich the environment during containment.

## **Repetition and duplication**

### **E. Repetition**

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

The vaccines in the companys R&D program are unique and proprietary to the company. To show that vaccines are compatible (combined or associated use), a number of safety and efficacy studies done with the individual products has to be repeated with the vaccines administered together according to international regulations and guidelines.

## **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.

The animals are housed socially, but animals might have to be housed (temporarily) [REDACTED] in order to [REDACTED]

██████████. Some studies may require limited bedding during containment. ██████████  
██████████ infection models it is necessary to collect the ██████████ in order to perform a visual inspection and to determine the ██████████ and / or total amount of ██████████. Therefore, no substrate can be offered in this type of studies.

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

### Classification of discomfort/humane endpoints

#### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Injections (for application of challenge material, injection with ██████████ drugs or agents) as well as sampling of blood are part of normal farm practice/veterinary care and will induce only mild discomfort. If the sampling is repeated (>5), the discomfort is considered to be moderate as a result of the stress when restrained and during handling of the animal.

All biotechnical procedures such as vaccination and blood sampling procedures have been described in Standard Operating Procedures (SOPs) (GLP accredited procedures).

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

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

Measurement of body temperatures and body weight, sampling urine, faeces, colostrum/milk, sampling on different mucosae ██████████ as well as ██████████ and pregnancy check are part of normal farm practice/veterinary care and will induce only mild discomfort.

If the following procedures (██████████ sampling or ██████████, puncture of ██████████ puncture ██████████ biopsy) are repeated the discomfort is considered to be moderate.

All biotechnical procedures such as inoculation and sampling procedures have been described in Standard Operating Procedures (SOPs) and only well trained personnel will be responsible for the execution (GLP accredited procedures).

██████████ animals are more susceptible to disease and might therefore encounter discomfort related to intercurrent diseases. Transport of the animals to the testing facility might cause transient discomfort for the duration determination the protection against challenge infection of the transport, especially for animals that are transported ██████████.

The pathogenicity of the pathogen / safety profile of the vaccine candidate used in the infection studies is not yet determined. Therefore, it is possible that adverse events occur.

Depending on the nature of the pathogen / vaccine candidate the discomfort of the infection can range from mild in the absence of any clinical signs (██████████) to moderate ██████████ and severe (██████████).

In case an infection model has to be developed for pathogens that do not cause clinical disease or only very mild disease, it might be necessary to ██████████ the animals. These procedures and any effects related to the ██████████ treatment are already taken into consideration for the discomfort levels and durations listed above in the respective tables.

The clinical health status of all animals is checked at least once a day by qualified personnel. Special attention is paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

In consultation with the veterinarian and Study Director, if treatment does not interfere with the test results, it will be decided whether to apply adequate veterinary care including analgesia to alleviate treatment related pain (for example infection studies with ██████████ pathogens or ██████████ ██████████ or pain not related to the treatment. In case of severe suffering, humane endpoints are applicable. General humane endpoints are described in an SOP (e.g. the condition of the animal prevents it from eating and drinking regularly, severe loss of body weight) and test specific humane endpoints are given in each study protocol if applicable.

Explain why these effects may emerge.

These procedures may be part of the experimental design. For vaccines intended for use in young animals, the study design may require that animals are vaccinated and / or infected ██████████ or when only a ██████████. In these cases, the young animals have to be ██████████ accordingly from the farm of birth to the testing facility.

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

All biotechnical procedures will only be performed according to standard procedures described in SOPs (GLP accredited procedures).

The number of samplings is reduced to a minimum number required to for a valid evaluation of results.

## 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.

The severity of discomfort is depending on the nature of the pathogen (see 3.1 of the project proposal for specific clinical signs of the pathogens involved). However, the duration of severe discomfort will be limited due to the application of a humane endpoint if needed.

General humane endpoints are applicable to all animals, irrespectively of the type of experiment.

### General Humane Endpoints:

- The animal experiences more than minor additional discomfort as a consequence of conditions resulting in long term or non-reversible inability to eat and or drink autonomously, fast or long lasting loss of weight, diseases or conditions that cause severe pain, suffering or discomfort such as bone fractions, force unnatural positioning and / or movements, open wounds or abscesses.
- Scientific endpoints: The target of the study reached / all planned samplings have been performed
- (Reliable and useful) results cannot be reached for reasons unrelated to the study

### Specific humane endpoints after infection with bovine pathogens

- In general, disease specific clinical signs (for example ██████████ or ██████████ clinical signs) do not normally lead to humane endpoints, but they may affect the general health of the animal (i.e. high fever, dullness, anorexia) leading to humane endpoints if
  - severe general clinical signs last for at least 2 days or the body temperature drops rapidly
  - the animal is unable to stand up and eat/dring actively for more than 1 day
- In the ██████████ are humane endpoints.

These test-specific humane endpoints are described in the corresponding study protocol. Each study protocol is reviewed by the AWB before execution of the study.

In case it is difficult to reach a decision based on the pre-defined criteria for an endpoint the designated veterinarian is empowered to decide that a humane endpoint is applied/reached.

Indicate the likely incidence.

Considering the expected number of studies with the different pathogens, the expected number of animals included in the different treatment groups (i.e. infected vs control group) and the expected severity, at most 30 % of the animals is expected to have severe discomfort that would require euthanasia.

#### **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').

For the infection studies the type and severity of the clinical signs are depending on the type of disease. Similar to natural field infections they may cause mild to severe pain, distress, suffering or even impending death. See B for an overview of the different pathogens involved, the maximal discomfort caused by the disease and the maximum number of animals expected to reach the highest discomfort category.

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Postmortem investigation can be part of the experimental design to evaluate (histo)pathological lesions at different organ systems and or to attempt re-isolation of the inoculum from tissues and organs. In addition, animals with a pathogen cannot be returned to the farm of origin or transported to another farm to prevent the spread of disease. Therefore, all animals might have to be euthanized at the end of the study or when a humane endpoint is reached. Control animals that have not been infected may be reused or returned to the farm of origin or transported to another farm. Moreover, return of the animals to commercial farms or slaughter for human consumption is often prohibited by the current legislation on use of antibiotics.

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



profile that is in line with criteria that have been laid down in EU directives, the Pharmacopoeia Europaea (Ph.Eur) and guidelines and regulations of the European Medicines Agency and other international regulatory bodies when applicable. Some fine-tuning of the composition (e.g. changes in antigens/adjuvant included) may be necessary before the optimal vaccine has been reached (proof of concept). In some cases it may not be possible to obtain proof of concept with the available candidates and knowledge of the pathogen, which means that the research project will be stopped.

During these orientating vaccination studies, it will also be attempted to find a serological correlate with protection or another surrogate immunological marker that will enable the drawing of conclusions on the efficacy of a candidate vaccine without challenge in further studies.

In case of [REDACTED] diseases, it might be necessary to mimic the [REDACTED] effect of [REDACTED] factors in order to reach the required sensitivity of the animals to the challenge infection with a [REDACTED] pathogen.

In case a vaccine is intended for protection against transplacental infection, pregnant animals are challenged at one or more specified stage of pregnancy. The animals are then observed until the end of pregnancy to determine the outcome of the pregnancy and the health status of the offspring. Samples might have to be taken from the offspring to determine the presence of the challenge strain or specific pre-colostral antibodies. [REDACTED]

---

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

Four or more of the following procedures will be undertaken depending on the characteristics of the vaccine/ pathogen involved; the types of pathogens are described under B (in italics the frequency of the procedures):

1. Daily observation / scoring clinical signs including measurement of rectal temperature ( [REDACTED] )
2. Weighing ( [REDACTED] )
3. Blood sampling [REDACTED] to determine [REDACTED] parameters and / or to determine the presence of the vaccine strain in the blood and / or to determine the presence of the challenge strain in the blood
4. Vaccine administration [REDACTED]
5. Palpation of the injection site [REDACTED]
6. [REDACTED] treatment by application of [REDACTED] and / or inoculation of [REDACTED]
7. Challenge administration [REDACTED]
8. Swabbing of (mucosal) surfaces [REDACTED] to determine the excretion of the vaccine and / or [REDACTED] ) to determine the excretion of the challenge strain
9. [REDACTED] to determine the presence of the challenge strain in the [REDACTED]
10. [REDACTED] to determine the presence of the challenge strain in the [REDACTED]
11. Urine, fecal, colostrum / milk samples [REDACTED] to determine the presence of the challenge strain
12. Punction of [REDACTED] or installation of a [REDACTED]
13. Punction [REDACTED]
14. [REDACTED] biopsy [REDACTED]
15. Pregnancy check [REDACTED]
16. Euthanasia

The duration of all procedures listed above will only be minutes at most. Typically, the length of the observation period after vaccination is [REDACTED] after each vaccination. If pregnant animals have to be followed until birth, the observation period will be longer, but in general, the total number of treatments does not increase.

The interval between vaccination and challenge infection or end of the study (in case of surrogate marker for protection) will be chosen in such a way that optimal protection is to be expected. The length of the observation period after challenge infection depends on the incubation period of the pathogen, but is

generally 1 to 4 weeks. To rule out that clinical signs are caused by an unintended co-infection, non-infected control animals may be included in a study. In addition, in models for neonatal disease in sheep and goats, ewes/goats may be required to give birth to and foster the lambs / kids but these will not be infected.



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

For new untested vaccine candidates it needs to be proven that they fulfil the required efficacy and safety criteria. Therefore, in initial studies small numbers of animals will be used that may not be sufficient to demonstrate statistically significant differences between treatment groups. However, with such studies it will be possible to gain an estimate of the variance between individual responses of the animals in a group at these particular observation points. This information will enable calculations to identify the minimum numbers of animals needed in the groups to give sufficient likelihood of obtaining a statistically significant result by which it can be judged that the treatments have had a real effect. In particular, the variance in the groups together with the magnitude of effect will be used in power calculations to achieve 80% power at the 95% confidence level (regarded by regulatory authorities as the standard by which such experiments should be designed).

## **B. The animals**

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

Studies will be performed in cattle, sheep and / or goats as appropriate. Animals of both sexes can be used for this type of animal experiment unless the study has to be performed in pregnant and / or lactating animals.

Purchase of animals: The animals will be purchased from commercial suppliers, obtained from affiliated farms or bred at [REDACTED] facilities.

If a certain microbial status is required, animals will be purchased from farms with the respective (certified) microbiological status and / or screened prior to inclusion in the study.

If the study design requires that the animals are vaccinated and / or infected at [REDACTED] or when only [REDACTED], the young animals have to be [REDACTED] accordingly from the farm of birth to the testing facility.

### Special requirements

If young animals with a specific antibody status are required, it is often necessary to warrant that [REDACTED]. As these [REDACTED] animals are more susceptible for intercurrent infections, they receive [REDACTED]. With the exception of studies against enteric pathogens, colostrum can be given to the animals from [REDACTED] as an aid in the prevention of [REDACTED].

### Age of animals:

Age of the animals for vaccine research varies from a few hours old to adult. The age of the animals to





Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 2 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 2 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 40%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Severe (max 50%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Cattle <6 Months old	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
New pathogen	Cattle <6 Months old	Moderate (max 100%) <sup>2</sup>	Max 2 wk

<sup>1</sup>Vaccines are given to [REDACTED] in order to [REDACTED]. This part of the study does only cause mild discomfort. The information given in the table above relates to the discomfort during challenge studies in [REDACTED] will be determined.

<sup>2</sup>: Studies with potential new pathogens are given the highest expected discomfort score until the severity of clinical signs has been established

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
[REDACTED]	Adult cows	Moderate (max 50%)	Max 2 wk
[REDACTED]	Adult cows	Moderate (max 50%)	Max 2 wk
[REDACTED]	Adult cows	Mild	Max 2 wk
[REDACTED]	Adult cows	Mild	Max 2 wk
[REDACTED]	Adult ewes	Mild	Max 2 wk
[REDACTED]	Adult ewes	Mild	Max 2 wk
New pathogen	Adult cows	Moderate (max 100%) <sup>1</sup>	Max 2 wk
New pathogen	Adult ewes	Moderate (max 100%) <sup>1</sup>	Max 2 wk

<sup>1</sup>: Studies with potential new pathogens are given the highest expected discomfort score until the severity of clinical signs has been established

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
[REDACTED]	Adult cows	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
[REDACTED]	Adult cows	Severe (max 50%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Adult cows	Severe (max 50%)	Max 1 wk
[REDACTED]	Adult cows	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
[REDACTED]	Adult cows	Severe (max 50%)	Max 1 wk
New pathogen	Adult cows	Severe (max 100%) <sup>1</sup>	Max 2 wk

<sup>1</sup>: Studies with potential new pathogens are given the highest expected discomfort score until the severity of clinical signs has been established

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
[REDACTED]	Adult cows	Moderate (max 70%)	Max 2 wk

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
[REDACTED]	Cattle <6 Months and adult cows	Moderate (max 50%)	Max 2 wk

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
[REDACTED]	sheep <6 Months	Severe (max 40%)	Max 1-2 d
[REDACTED]	cattle <6 Months	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
[REDACTED]	sheep <6 Months	Moderate (max 70%)	Max 2 wk
[REDACTED]	Adult cows	Severe (max 70%)	Max 1-2 days
[REDACTED]	sheep <6 Months	Severe (max 50%)	Max 1 wk
[REDACTED]	cattle <6 Months	Moderate (max 70%)	Max 1 wk
[REDACTED]	sheep <6 Months	Mild	Max 2 wk
[REDACTED]	cattle <6 Months	Mild	Max 2 wk
[REDACTED]	cattle <6 Months	Mild	Max 2 wk
[REDACTED]	cattle <6 Months	Mild	Max 2 wk
[REDACTED]	cattle <6 Months	Severe (max 50%)	Max 1-2 d
[REDACTED]	sheep < 6 Months	Severe (max 50%)	Max 1-2 d
[REDACTED]	cattle <6 Months	Mild	Max 2 wk
[REDACTED]	sheep < 6 Months	Mild	Max 2 wk
New pathogens and new types of models (eg. [REDACTED])	cattle <6 Months sheep < 6 Months	Severe (max 100%) <sup>2</sup>	Max 1 w

<sup>1</sup> Efficacy of [REDACTED] vaccines in ruminants is tested by [REDACTED] only

<sup>2</sup>: Studies with potential new pathogens are given the maximum discomfort score until the severity of clinical signs has been established

Based on the experience over the last 5 years and the current R&D program and priorities, the total expected number of cattle, sheep and goat per age group and discomfort category is the following:

Species	Discomfort score*	Animals <6 Months	Adult**

Cattle	Mild	■	■
	Moderate	■	■
	Severe	■	■
Sheep	Mild	■	■
	Moderate	■	■
	Severe	■	■
Goat	Mild	■	■
	Moderate	■	■
	Severe	■	■

\*: Discomfort due to disease

\*\* : Including [REDACTED]

\*\*\*: Due to repeated procedures the overall discomfort will be moderate in at most 50 % of the animals

[REDACTED]

In the vaccination studies, one or more vaccinated groups are compared to an unvaccinated control group. The group size is dependent on the challenge model and the age of the animal at the time of challenge, as for some pathogens the susceptibility for infection/disease will diminish with age, making the use of relatively large group sizes necessary to be able to show a statistically significant difference. In general, the group size used will be [REDACTED], but could be larger depending on the expected variation in the infection model.

The expected numbers per category of vaccine are:

Per Model	Cattle <6Months	Adult cattle	Sheep <6Months	Adult sheep	Goat <6Months	Adult goat
[REDACTED]	■	■	■	■	■	■
[REDACTED]	■	■	■	■	■	■
[REDACTED]	■	■	■	■	■	■
[REDACTED]	■	■	■	■	■	■
[REDACTED]	■	■	■	■	■	■
[REDACTED]	■	■	■	■	■	■
[REDACTED]	■	■	■	■	■	■
[REDACTED]	■	■	■	■	■	■
[REDACTED]	■	■	■	■	■	■

For the vaccines that are currently in the research phase, challenge will still have to be performed in [REDACTED] of the models to prove efficacy because of the absence of an immunological correlate of protection.

**C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

Re-use might be considered for animals that experience only minor discomfort during the first study, for example uninfected control animals. This approach is considered acceptable especially in case of animals that were raised under special conditions (e.g. [REDACTED]) to achieve a certain [REDACTED] status.

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

xNo

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.

##### Replacement:

In accordance with international regulations, animals of the target species must be used to demonstrate the safety and efficacy of a vaccine because there are no suitable alternatives or models for the induction of immunity in a whole organism or for the infection of living tissues as complex as those found in the whole animal in which the vaccines are intended to have efficacy. Therefore, during the research phase, candidate vaccines have to be tested in the same models.

Reduction: All studies are performed with the lowest possible number of animals that are required to enable meaningful interpretation of the results. This will be achieved through an ongoing evaluation of the observations in each study. The number of animals per study will be substantiated in each study protocol. According to internal procedures, the study protocol will be reviewed by the Animal Welfare Body and a statistician.

##### Refinement:

Where possible it is pursued to refine the routes of administration of substances and sampling techniques to improve animal welfare/to reduce discomfort of administration, but without endangering the scientific outcome. Ruminants are the target species and there are no other less innervated/sentient species that could be a model for the ruminant diseases that are studied. See next paragraph for other refinement methods that are applied.

The classic method to prove protection of a new vaccine is efficacy in a vaccination-challenge test. However, if immunological correlates of protection (e.g. a serological response) can be used to prove efficacy this will be used rather than challenge infection. When an infection model has to be used, humane endpoints will be employed and staff will be fully trained to recognize animals that experience discomfort. Animals will be closely monitored and additional health checks are performed to ensure that no animal is left suffering.

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

For monitoring of the clinical health status of animals, all study animals will be checked at least once a day by a certified person. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

Furthermore efforts are made to optimally enrich the environment during containment.

### **Repetition and duplication**

#### **E. Repetition**

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

The vaccines in the company's R&D program are unique and proprietary to the company. To show that vaccines are compatible (combined or associated use), a number of the safety and efficacy studies done with the individual products has to be repeated with the vaccines administered together according to international regulations and guidelines.

### **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

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

The animals are housed socially, but animals might have to be housed [REDACTED] in order to [REDACTED]. Some studies may require limited bedding during containment. ~~In a few cases~~ [REDACTED]. ~~In [REDACTED] infection models it is necessary to collect the [REDACTED] in order to perform a visual inspection and to determine the [REDACTED] and / or total amount of [REDACTED]. Therefore, no substrate can be offered in this type of studies.~~

#### 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.

XYes > 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.

Vaccination, injections (for application of challenge material, injection with [REDACTED] drugs or agents) as well as sampling of blood-are part of normal farm practice/veterinary care and will induce only mild discomfort. If the sampling is repeated (>5), the discomfort is considered to be moderate as a result of the stress when restrained and during handling of the animal.

All biotechnical procedures such as vaccination and blood sampling procedures have been described in Standard Operating Procedures (SOPs) and only well trained personnel will be responsible for the execution (GLP accredited procedures).

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

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

Measurement of body temperatures and body weight, sampling urine, faeces, colostrum/milk, sampling on different mucosae ([REDACTED] as well as [REDACTED] are part of normal farm practice/veterinary care and will induce only mild discomfort. **If the following procedres [REDACTED] sampling or [REDACTED], punction of [REDACTED] punction [REDACTED] biopsy) are repeated the discomfort is considered to be moderate.**

All biotechnical procedures such as vaccination and sampling procedures have been described in Standard Operating Procedures (SOPs) and only well trained personnel will be responsible for the execution (GLP accredited procedures).

[REDACTED] animals are more susceptible to disease and might therefore encounter discomfort related to intercurrent diseases. Transport of the animals to the testing facility might cause transient discomfort for the duration of the transport, especially for animals that are transported [REDACTED]

Vaccination can cause a transient increase in rectal temperature, sometimes accompanied with a reduced

level of activity, and a transient vaccination site reaction. Systemic reactions generally disappear within 24 hours, but local reactions (that are generally painless) can persist for several days and even weeks. The safety and efficacy profile of the vaccine compositions used in the research phase is not yet determined. Therefore, it is possible that adverse events occur or that protection of the vaccinated animals is very limited.

Depending on the nature of the challenge inoculum the discomfort of the challenge can range from mild in the absence of any clinical signs (e.g. [REDACTED]) to moderate (e.g. [REDACTED]) and severe (e.g. [REDACTED]). Vaccination will result in a significant reduction of clinical abnormalities after challenge compared to the unvaccinated control group and thus to a reduction of animals with discomfort.

In case of challenge studies with pathogens that do not cause clinical disease or only very mild disease, it might be necessary to [REDACTED] the animals. These procedures and any effects related to the [REDACTED] treatment are already taken into consideration for the discomfort levels and durations listed above in the respective tables.

The clinical health status of all animals is checked at least once a day by qualified personnel. Special attention is paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

In consultation with the veterinarian and Study Director, if treatment does not interfere with the test results, it will be decided whether to apply adequate veterinary care including analgesia to alleviate treatment related pain (for example infection studies with Mastitis pathogens or Foot and Mouth Disease virus) or pain not related to the treatment. In case of severe suffering, humane endpoints are applicable. General humane endpoints are described in an SOP (e.g. the condition of the animal prevents it from eating and drinking regularly, severe loss of body weight) and test specific humane endpoints are given in each study protocol if applicable.

---

Explain why these effects may emerge.

These procedures may be part of the experimental design. For vaccines intended for use in young animals, the study design may require that the animals are vaccinated and / or infected [REDACTED] or when only a [REDACTED]. In these cases, the young animals have to be [REDACTED] accordingly from the farm of birth to the testing facility.

---

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

All biotechnical procedures will only be performed according to standard procedures described in SOPs (GLP accredited procedures).

The number of samplings will be done in accordance with the respective guidelines or if no requirements are given, the number of samplings is reduced to a minimum number required to for a valid evaluation of results.

---

## **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.

To determine the efficacy of a vaccine it is necessary to challenge animals with the pathogenic organism. The severity of discomfort is depending on the nature of the pathogen (see 3.1 of the project proposal for specific clinical signs of the pathogens involved). However, the duration of severe discomfort will be limited due to the application of a humane endpoint if needed.

General humane endpoints are applicable to all animals, irrespectively of the type of experiment.

General Humane Endpoints:

- The animal experiences more than minor additional discomfort as a consequence of conditions resulting in long term or non-reversible inability to eat and or drink autonomously, fast or long lasting loss of weight, diseases or conditions that cause severe pain, suffering or discomfort such as bone fractions, force unnatural positioning and / or movements, open wounds or abscesses.
- Scientific endpoints: The target of the study reached / all planned samplings have been performed
- (Reliable and useful) results cannot be reached for reasons unrelated to the study

Specific humane endpoints after infection with bovine pathogens

- In general, disease specific clinical signs (for example [redacted] or [redacted] clinical signs) do not normally lead to humane endpoints, but they may affect the general health of the animal (i.e. high fever, dullness, anorexia) leading to humane endpoints if
  - severe general clinical signs last for at least 2 days or the body temperature drops rapidly
  - the animal is unable to stand up and eat/dring actively for more than 1 day
- In the [redacted] are humane endpoints.

These test-specific humane endpoints need to be described in the corresponding study protocol. Each study protocol is reviewed by the AWB before execution of the study.

In case it is difficult to reach a decision based on the pre-defined criteria for an endpoint the designated veterinarian is empowered to decide that a humane endpoint is applied/reached.

Indicate the likely incidence.

Considering the expected number of studies with the different pathogens, the expected number of animals included in the different treatment groups (i.e. vaccinated / infected / control group) and the expected severity, at most 20 % of the animals is expected to have severe discomfort that would require euthanasia.

**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').

For studies without challenge, discomfort will be mild to moderate depending on the number of sampling points. For vaccination-challenge studies, the type and severity of the clinical signs are depending on the type of challenge infection. Similar to natural field infections they may cause mild to severe pain, distress, suffering or even impending death. See B for an overview of the different pathogens involved, the maximal discomfort caused by the disease and the maximum number of animals expected to reach the highest discomfort category. Vaccination is expected to reduce the level of discomfort after challenge, but the non-vaccinated control group will experience the symptoms of the natural infection.

**End of experiment**

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Postmortem investigation can be part of the experimental design to evaluate (histo)pathological lesions at the injection sites and or to evaluate effect of the infection on different organ systems and or to attempt re-isolation of the inoculum from tissues and organs.

In addition, animals vaccinated with a non-licensed vaccine or infected with a pathogen cannot be returned to the farm of origin or transported to another farm to prevent the spread of disease.

Therefore, all animals might have to be euthanized at the end of the study or when a humane endpoint is reached. Control animals that have not been vaccinated and infected may be reused or returned to the farm of origin or transported to another farm. In case of a surrogate immunological marker (no challenge), animals housed on contract farms can remain on the farm or transported to other farms until the end of their natural/economic life.

Moreover, return of the animals to commercial farms or slaughter for human consumption is often prohibited by the current legislation on use of antibiotics.

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.

X Yes





## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 22100
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. [REDACTED]
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure                                    |
|---------------|---|
| 3             | Research: Assay development and preparation of biomaterials |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The potency of each inactivated vaccine batch used in development studies has to be determined to set the limits for release and to determine the stability. Traditionally, the potency of inactivated vaccines, is measured in a so-called *in vivo* potency in [REDACTED]. During the research phase of a vaccine project, the test protocol for the potency test is determined. In an initial study, the strength of the immune response is compared between the different animal species. In further studies, it is investigated, whether the antibody response is dose dependent and the release criteria are determined.

Apart from the replacement of experimental animals, *in vitro* potency tests are very much preferred over *in vivo* testing for multiple other reasons including costs and timelines. However, for several inactivated vaccines, *in vivo* potency tests are still necessary because it is either not possible to determine the antigen and/or adjuvant content *in vitro* or an *in vivo* batch test is mandatory under the respective legislation (e.g. Ph.Eur monograph.).

In such a batch potency test, animals are injected with one or more doses of the vaccine batch. The potency is preferably determined by measuring the antibody response. In a few cases, determination the protection against challenge infection is mandatory or necessary for scientific / technical reasons. Biomaterials such as specific antisera or monoclonal antibodies are needed in most vaccine projects for different purposes such as the identification, characterisation and quantification of the vaccine strain, neutralizing the vaccine virus, setting up *in vitro* tests et cetera.

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

Two or more of the following treatments will be employed in order to fulfil the requirements for the potency studies as laid down in the Ph Eur (*in italics the frequency of the treatments*). The same

treatments are also applied for the preparation of biomaterials:

1. Blood sampling [REDACTED] to determine [REDACTED] parameters

2. Test substance administration [REDACTED]

3. Weighing [REDACTED]

4. Euthanasia

The duration of these procedures will only be minutes.

In case of potency tests that involve challenge infection, the following additional treatments are employed

5. Administration of challenge material [REDACTED]

6. Clinical observation [REDACTED]

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

The group sizes for potency tests that are specified in guidelines typically range between 5 and 10. For those models that are not described in specific regulations, a group size of 5-10 animals is generally accepted by regulatory authorities. If sufficient knowledge on the variation is available the group size will be calculated such that a statistically significant difference between standard and substandard vaccine batches can be made with 80% power and 95% confidence.

For the preparation of antisera the minimal number of animals that will provide the required volume will be used.

For the preparation of monoclonal antibodies, 5 mice will be used per antigen.

## **B. The animals**

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

For some vaccines, the species to be used for a batch potency test is prescribed in a Ph.Eur monograph. In general, [REDACTED] are preferred over the ruminant target species because they are more genetically homogeneous and better microbiologically controlled.

Therefore, less variance in response and better reproducibility can be achieved, which means that the number of experimental animals can be lower than when using ruminants.

For some vaccines, the type of laboratory animals to be used for a batch potency test is prescribed in a Ph.Eur monograph.

Preparation of antisera in non-ruminant animals or murine monoclonal antibodies has the advantage, that these animals are free of antibodies against other ruminant pathogens.

Based on the experience over the last 5 years and the current R&D program and priorities, the total expected number of laboratory animals is the following:

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] of both sexes will be used, but for [REDACTED] only females will be included in studies because of a higher risk of fighting in male animals and the relatively long time that the animals are in an experiment. With regard to the length of these experiments (1-2 months) it is not acceptable to use males, because they would need to be single housed.

Welfare concerns are the basis for the preferred use of female [REDACTED] because they hardly fight. Data from recently executed experiments with male animals have shown that in half of the experiments there was a loss of animals because of severe fighting. This has resulted in the repetition of these experiments and therefore in the use of more animals. A loss of animals due to fighting has never occurred when female animals were used. We consider the aggression and fighting a worrying impairment of welfare. Moreover, the aggression will cause stress, which is known to have effects on the immune system.

In addition, use of animals of both sexes would increase the variability and thereby increase the number of animals needed.

In these studies the functioning of the immune system is crucial and variation in the immune response

caused by external factors should be avoided as much as possible.

Origin [REDACTED]:

All animals are supplied by certified vendors accompanied by a health certificate according to FELASA recommendations. All purchased animals have a SPF status.

Origin [REDACTED]

Own [REDACTED] breeding unit or commercial vendor.

Age of animals:

The required species and age (or weight) is usually designated as the most sensitive species or age for the test component in question. If such specific knowledge is not available the most practical choices are made, based on possibilities for purchase and housing conditions. Moreover, animals must be immunologically fit to be subjected to immunizations and blood samplings.

---

### 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.

Replacement:

Apart from the replacement of experimental animals, *in vitro* potency tests are very much preferred over *in vivo* testing for multiple other reasons including costs and timelines. Therefore, multidisciplinary teams are active at the company to replace *in vivo* potency tests by *in vitro* tests such as antigenic mass assays for the potency testing of vaccines.

Reduction: The animal species that is expected to give the most discriminatory test with the smallest number of animals will be used. The number of animals per study will be substantiated in each study protocol. Each study protocol will be reviewed by the Animal Welfare Body and a statistician.

Refinement: Following the codes of practice for immunization is the basis for refinement in these animal procedures. Where possible it is pursued to refine the routes of administration of substances and sampling techniques to improve, but without endangering the scientific outcome. For example; blood sampling in rodents is done under anesthesia. See next paragraph for other refinement methods that are applied.

Where ever possible, potency testing will be based on the testing of antibodies or other correlates of protection rather than by challenge.

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

Following the code of practice for immunization and the code of practice for monitoring the welfare of the animals is the basis for refinement in these animal procedures.

In general animals are always housed socially, but animals might have to be (temporarily) separated due to fighting or because of veterinary concerns. Furthermore, to enhance animal welfare, species specific environmental enrichment is provided to all animals.

---

For monitoring of the clinical health status of animals, all study animals will be checked at least once a day by a certified person. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

## 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.

A potency test model needs to be developed for a specific vaccine. Experiences from vaccines with similar composition can be used, but eventually, the model has to be validated for the specific vaccine. Specific biomaterials have to be available for each project. Prior to the preparation of new biomaterials, the scientific literature and the company database for biomaterials available at the different research sites will be consulted in order to prevent unnecessary preparation of new biomaterials.

## 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

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

Some studies may require limited bedding during containment.

### 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, analgesia or other pain relieving methods be used?

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

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

Injections (vaccination, inoculation of challenge material) and blood sampling are part of normal veterinary care / commonly used biotechnical procedures and will induce only mild discomfort or moderate discomfort of very short duration.

Anesthesia will be applied during blood sampling of mice, guinea pigs and rats. Anesthesia will not be applied during sampling blood from chickens and rabbits. In these species blood sampling causes only

mild discomfort or moderate discomfort of very short duration. Applying anesthesia would only increase discomfort as the animal needs to be restrained during administration.

For each species blood sampling and other biotechnical procedures have been described in Standard Operating Procedures (SOPs) (GLP accredited procedures).

As the vaccines to be tested have already been found to be safe in the target species (ruminants) it is very unlikely that they will cause adverse effects in non-target animals.

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

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

In general, biotechnological procedures such as weighing and sampling may result in discomfort, because animals need to be fixated and especially if performed repeatedly.

Moreover, application of the vaccine can result in a transient increase in rectal temperature, sometimes accompanied with a reduced level of activity, and a transient vaccination site reaction. Systemic reactions will generally disappear within 24 hours, but local reactions (swelling redness), that are generally painless, can persist for several days and even weeks, but these local reactions do not affect normal behaviour (activity, feeding and drinking).

Depending on the nature of the challenge inoculum, the discomfort of the challenge can range from mild in the absence of any clinical signs (e.g. [REDACTED]) to moderate (e.g. [REDACTED]) and severe (e.g. [REDACTED]). Vaccination will result in a significant reduction of clinical abnormalities after challenge compared to the unvaccinated control group.

For monitoring of the clinical health status of animals, all study animals will be checked at least once a day by a certified person. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

In case animals experience discomfort (whether or not related to the treatment), it will be decided in consultation with the veterinarian and Study Director whether to apply adequate veterinary care to alleviate unexpected pain and/or distress (if treatment does not interfere with the test results). In case of severe suffering, humane endpoints are applicable. General humane endpoints are described in an SOP (e.g. the condition of the animal prevents it from eating and drinking regularly, severe loss of body weight) and test specific humane endpoints are given in each study protocol if applicable.

Explain why these effects may emerge.

These procedures and if applicable the clinical signs caused by the challenge may be part of the experimental design.

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

Weighing is part of normal veterinary care and will induce only mild discomfort. Taking samples of mucosal surfaces or urine will result in mild discomfort, with the exception of repeated mucosal swabbing, which is considered to be moderate discomfort. Biotechnical procedures have been described in SOPs (GLP accredited procedures). Unless required by the applicable regulations or scientific reasons, potency testing will be based on the testing of correlates of protection such as antibody levels rather than by challenge.

### **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 potency tests that require challenge with a pathogenic organism, the severity of discomfort is depending on the nature of the pathogen. However, the duration of severe discomfort will be limited due to the application of a humane endpoint if needed.

General humane endpoints are applicable to all animals, irrespectively of the type of experiment.

#### General Humane Endpoints:

- The animal experiences more than minor additional discomfort as a consequence of conditions resulting in long term or non-reversible inability to eat and or drink autonomously, fast or long lasting loss of weight, diseases or conditions that cause severe pain, suffering or discomfort such

- as bone fractions, force unnatural positioning and / or movements, open wounds or abscesses.
- Scientific endpoints: The target of the study reached / all planned samplings have been performed
- (Reliable and useful) results cannot be reached for reasons unrelated to the study

Specific humane endpoints after infection with bovine pathogens

- In general, disease specific clinical signs (for example [REDACTED] [REDACTED] clinical signs) do not normally lead to humane endpoints, but they may affect the general health of the animal (i.e. high fever, dullness, anorexia) leading to humane endpoints if
  - severe general clinical signs last for at least 2 days or the body temperature drops rapidly
  - the animal is unable to stand up and eat/drink actively for more than 1 day

These test-specific humane endpoints are described in the corresponding study protocol. Each study protocol is reviewed by the AWB before execution of the study.

In case it is difficult to reach a decision based on the pre-defined criteria for an endpoint the designated veterinarian is empowered to decide that a humane endpoint is applied/reached.

Indicate the likely incidence.

As the overall majority of potency tests as well as the preparation of biomaterials do not require challenge, the incidence of severe discomfort requiring euthanasia is estimated to be less than 2 %.

**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').

Discomfort will be mild ( $\geq 75\%$ ) to moderate ( $\leq 25\%$ ) depending on the number of sampling points, type of biotechnical procedure and whether the challenge infection causes disease in the model animal.

**Challenge infection will be performed in [REDACTED] of the animals.**

**End of experiment**

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

For some potency models it is necessary to investigate the presence of (histo)pathological lesions and take organ and tissue samples for re-isolation of the vaccine strain.

For the preparation of antisera it is necessary to kill the animals in order to obtain the required volumes.

For preparation of monoclonal antibodies mice are killed to collect the lymphoid organs that are needed

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.

X Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**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  
AVD2210020171629

**Bijlagen**

1

Datum 14 juni 2017  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven



Op 2 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Research of new ruminant vaccines" met aanvraagnummer AVD2210020171629. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 23 mei en 9 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof meer achtergrondinformatie over de infecties, onderbouwing van de keuzemomenten, de reden van afwijkende huisvesting, het te verwachten ongerief van de dieren, onderbouwing van het gebruik van vrouwelijke dieren, betere beschrijving van de humane eindpunten, het totaal aantal te onderzoeken vaccins, het aantal nakomelingen dat gebruikt wordt in het project, het ontbreken van bedding in sommige studies en het aantal dieren dat een challenge zal ondergaan.

#### **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.

Er is gevraagd om wetenschappelijk te onderbouwen waarom niet beide geslachten gebruikt kunnen worden. Uw antwoord hierop is niet voldoende onderbouwd, daarom moeten voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.3 beide geslachten in evenredige aantallen gebruikt worden.

U kunt met uw project "Research of new ruminant vaccines" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 september 2017 tot en met 31 augustus

2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning een looptijd van maximaal 5 jaar kan hebben.

**Datum:**  
14 juni 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD2210020171629

vaccins te

Voor het vervoer van jonge of drachtige dieren wordt Bijlage I, Hoofdstuk 1 van de Europese Transportverordening (EG nr. 1/2005) in acht genomen. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Beoordeling achteraf**

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage. Er is sprake van ernstig ongerief.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie [REDACTED] [REDACTED] gevoegd. Dit advies is opgesteld op 2 mei 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

In aanvulling op het DEC-advies stelt de CCD voorwaarden. De voorwaarden staan in de vergunning beschreven. Voor het overige nemen wij het advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. 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.

**Datum:**  
14 juni 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD2210020171629

**Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: [REDACTED]

Adres: [REDACTED]

Postcode en plaats: [REDACTED]

Deelnemersnummer: [REDACTED]

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 september 2017 tot en met 31 augustus 2022, voor het project "Research of new ruminant vaccines" met aanvraagnummer AVD2210020171629, volgens advies van Dierexperimentencommissie [REDACTED]. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies. Er worden aanvullende voorwaarde(n) gesteld. Beide geslachten moeten worden gebruikt in Bijlage 3.4.4.3. Daarnaast is het enkel toegestaan tegen de in het projectvoorstel genoemde pathogenen vaccins te ontwikkelen. [REDACTED]

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 2 mei 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. 2 mei 2017, ontvangen op 2 mei 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 23 mei en 9 juni 2017

**Aanvraagnummer:**  
AVD2210020171629

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1 Research: Infection studies in ruminants</b>				Runderen: ■■■ kalveren < 6 maanden; ■■■ volwassen dieren Schapen: ■■■ lammeren < 6 maanden; ■■■ volwassen dieren Geiten: ■■■ lammeren < 6 maanden; ■■■ volwassen dieren
	Runderen (Bos taurus) /	■■■	■■■ Ernstig ■■■ Matig ■■■ Licht	
	Schapen (Ovis aries) /	■■■	■■■ Ernstig ■■■ Matig ■■■ Licht	
	Geiten (Capra aegagrus hircus) /	■■■	■■■ Ernstig ■■■ Matig ■■■ Licht	
<b>3.4.4.2 Research: Vaccination challenge studies in ruminants</b>				

**Aanvraagnummer:**  
 AVD2210020171629

	Runderen ( <i>Bos taurus</i> ) /	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Ernstig <input checked="" type="checkbox"/> Matig <input type="checkbox"/> Licht	
	Schape (Ovis aries) /	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Ernstig <input checked="" type="checkbox"/> Matig <input type="checkbox"/> Licht	
	Geiten ( <i>Capra aegagrus hircus</i> ) /	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Ernstig <input checked="" type="checkbox"/> Matig <input type="checkbox"/> Licht	
<b>3.4.4.3 Research: Assay development and preparation of biomaterials</b>				
	Konijnen ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ) /	700	<input checked="" type="checkbox"/> Matig <input checked="" type="checkbox"/> Licht	
	Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) /	650	<input checked="" type="checkbox"/> Matig <input checked="" type="checkbox"/> Licht	
	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) /	650	<input checked="" type="checkbox"/> Matig <input checked="" type="checkbox"/> Licht	

**Aanvraagnummer:**  
AVD2210020171629

	Cavia's (Cavia porcellus) /	550	Matig Licht	
	Kippen /	700	Matig Licht	

#### **Voorwaarden**

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

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2022 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

Gedurende de looptijd van de vergunning, koppelt de aanvrager aan de CCD terug welk soort vaccin tegen welke aandoening in welk type dierproef met wijze van uitvoering in welke diersoort en bijbehorend ongerief is uitgevoerd onder deze vergunning. Deze terugkoppeling moet uiterlijk 31 januari door de CCD ontvangen zijn en rapporteert over het afgelopen kalenderjaar (1 januari - 31 december). Ook wanneer er geen dierstudies zijn uitgevoerd wordt dit gerapporteerd. De CCD kan op basis van deze terugkoppeling aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Wanneer u overtuigend en onbetwistbaar kan aantonen dat er geen gegevens over de geteste stof kunnen worden vrijgegeven omdat de opdrachtgever deze als vertrouwelijke informatie heeft geclassificeerd kunt u deze informatie buiten de rapportage houden.

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning.

**Aanvraagnummer:**  
AVD2210020171629

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.

Mannelijke en vrouwelijke dieren moeten in evenredige aantallen gebruikt worden in Bijlagen Dierproeven 3.4.4.3, tenzij het onderzoek naar [REDACTED]. Indien gedurende het project blijkt dat er geslachts-specifieke effecten zijn, kunt u deze informatie als wijziging rapporteren aan de CCD. Deze informatie kan voor de CCD aanleiding zijn om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten te wijzigen of in te trekken.



**Aanvraagnummer:**  
AVD2210020171629

## Weergave wet- en regelgeving

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

**Aanvraagnummer:**  
AVD2210020171629

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

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

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

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

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

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

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

#### **Beoordeling achteraf**

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



Inventaris Wob-verzoek W17-11										
			wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document NTS 20171632	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x			
2	NTS initieel			x						
3	Projectvoorstel				x	x				
4	Bijlage beschrijving dierproeven initieel				x	x				
5	DEC-advies				x	x				
6	Ontvangstbevestiging				x		x			
7	Verzoek om aanvullende informatie				x		x			
8	NTS aangepast	x								
9	Bijlage beschrijving dierproeven aangepast				x	x				
10	Adviesnota CCD		x						x	
11	Beschikking en vergunning				x		x			

03 MEI 2017



## 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.*

Ja > Vul uw deelnemernummer in 11500  
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

Naam instelling of organisatie UMC Utrecht

Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde

KvK-nummer 30244197

- 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 Instatie voor Dierenwelzijn

Postbus 12007

Postcode en plaats 3501AA

IBAN NL27INGB0000425267

Tenaamstelling van het rekeningnummer Universiteit Utrecht

- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters  Dhr.  Mw.

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

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

(Titel) Naam en voorletters  Dhr.  Mw.

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning. (Titel) Naam en voorletters = [redacted] Functie [redacted] Afdeling [redacted] Telefoonnummer [redacted] E-mailadres [redacted]

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  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 dieproef 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 dieproef waar al een vergunning voor is verleend?  Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6  Nee > Ga verder met vraag 3

3 Over uw project

3.1 Wat is de geplande start- einddatum van het project? Startdatum 01 - 07 - 2017 Einddatum 01 - 07 - 2022

3.2 Wat is de titel van het project? Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe holmium microscoper formuleringen voor intracerebrale injectie

3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting? Ontwikkeling van holmium bolletjes voor behandeling van tumoren

3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt? Naam DEC [redacted] Postadres [redacted] E-mailadres [redacted]

## 3

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- Bijlage Beschrijving dierproeven

## 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 1.6). 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.
- 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

2



## Format

### Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

## 1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project | Ontwikkeling van holmium bolletjes voor behandeling van tumoren
- 1.2 Looptijd van het project | Vijf jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Holmium, bolletjes, kanker, behandeling

## 2 Categorie van het project

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

### 3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- Binnen het kankeronderzoek heeft deze onderzoeksgroep in het verleden een nieuw medisch hulpmiddel ontdekt: radioactieve holmium-bolletjes. Na proefdieronderzoek werden deze bolletjes uiteindelijk geschikt bevonden voor het behandelen van patiënten met tumoren in de lever. Daarnaast is deze vinding in een bedrijf verder ontwikkeld waardoor deze behandeling in patiënten wereldwijd toegepast kan gaan worden. In dit nieuwe dierproefproject zal worden onderzocht of de bolletjes ook gebruikt kunnen worden bij andere vormen van kanker. Omdat de hoeveelheid holmium in de bolletjes erg laag is, hebben we nieuwe holmiumbolletjes ontwikkelt en deze in het laboratorium uitgebreid getest op cellen en op 'slachtafval'. Hierdoor hebben we een beeld van hoe deze deeltjes zich gedragen in het weefsel.
- Voordat deze nieuwe bolletjes als behandeling van kanker in de mens toegepast mag worden, is het belangrijk om van de nieuwe bolletjes het gedrag in het lichaam te weten. Om de veiligheid en het precieze behandelingseffect in kaart te brengen is het testen in dieren (met en zonder tumoren) een onvermijdelijke en essentiële stap.
- Dit onderzoek heeft concreet de volgende onderzoeksdoeleinden:
- het optimaliseren van de nieuwe holmiumbolletjes, waarbij het uiteindelijke doel is een verbetering van de lokale behandeling van de tumor.
  - Na uitgebreid testen in 'slacht afval' wordt de reactie van het weefsel onderzocht door de verdeling in de tumor te bepalen. (rat)
  - Het bepalen van de effect van holmium bolletjes op de groei van een tumor (konijn)
  - Als laatste wordt gekeken of de toediening van deze holmiumbolletjes op de langere termijn schade aan omliggende gezonde weefsels of organen geeft. (muis en konijn)
- In deze aanvraag worden maximaal vier nieuwe holmiumbolletjes met hierbij twee mogelijke toedieningsvloeistoffen.
- 
- 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?
- In dit onderzoek zal uitvoerig worden onderzocht hoe stabiel de holmium bolletjes zijn, hoe goed deze werken tegen kanker en hoe veilig de bolletjes zijn. Indien er veelbelovende resultaten worden behaald, zullen de bolletjes ook gebruikt gaan worden bij toekomstige patiënten.
- 
- 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?
- Totaal worden er maximaal 1200 muizen; 850 ratten en 346 konijnen ingezet in deze studie.
- 
- 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?
- Hoewel het noodzakelijk is om in een deel van de gebruikte dieren tumoren te laten groeien zullen ze hier weinig last van ondervinden. De tumoren zullen klein zijn en nauw in de gaten worden gehouden. Alle handelingen die pijn of beangstigend kunnen zijn worden onder een roesje of met pijnstilling uitgevoerd. De meeste voorkomende ongerief zal zijn het ontwaken uit narcose. Narcose is noodzakelijk om beeldvorming uit te voeren of pijnloos de holmium bolletjes toe te dienen.

- |     |   |  |
|-----|---|--|
| 3.5 | Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | De dieren zullen matig ongerief ondervinden.   |
| 3.6 | Wat is de bestemming van de dieren na afloop?                               | De dieren worden dood gemaakt om aan het eind van het experiment de tumoren te onderzoeken en het omliggende weefsel en organen te controleren op eventuele schade ten gevolge van de behandeling. |

## 4 Drie V's

- |     |   |  |
|-----|---|--|
| 4.1 | <b>Vervanging</b><br>Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdier vrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden. | Voordat de bolletjes in de dieren worden getest zijn ze eerst uitgebreid onderzocht door experimenten op het laboratorium. Hierbij kan men denken aan celkweek experimenten en ex-vivo experimenten ('slacht afval')<br><br>Maar uiteindelijk is kanker – naast een veel voorkomende – ook een ingewikkelde ziekte. Hierdoor zijn de resultaten uit het laboratorium niet goed vergelijkbaar met hoe dit in het 'levende wezen' is. Het is daarom niet mogelijk om alleen bij 'reageerbuis experimenten' te blijven. Indien we werkelijk willen weten hoe deze bolletjes tegen kanker werken en wat de bijwerkingen zijn is het testen in dieren noodzakelijk. |
| 4.2 | <b>Vermindering</b><br>Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.  | Er wordt op basis van berekeningen gewerkt met het minimaal aantal dieren om een uitspraak te kunnen doen over de werkzaamheid van de behandeling.   |
| 4.3 | <b>Verfijning</b><br>Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest  | Omdat het binnen het beschreven onderzoek noodzakelijk is om tumoren te groeien in de dieren is ervoor gekozen om de tumoren zo klein mogelijk te houden. De dieren worden dan ook regelmatig hierop gecontroleerd. Wanneer blijkt dat het dier hier ongerief van gaat ondervinden (wat van te voren valt te voorspellen en dus te voorkomen) laten we het dier inslapen om onnodig ongerief te voorkomen. Indien nodig krijgen de dieren pijnstilling.  |

verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Op het moment dat er holmium-bolletjes injecties worden gegeven, scans plaats vinden of andere ingrijpende handelingen worden uitgevoerd wordt er gebruik gemaakt van verdoving om zo alle stress en ongemak te beperken.

De dieren worden regelmatig gehandeld om dit niet als een stressvolle ervaring te laten ervaren.

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

Verdoving, pijnstilling en regelmatige controle op het welzijn van het dier.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf





## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

Sinds 1994 is er intensief onderzoek gedaan naar radioactieve microsferen voor de behandeling van verschillende oncologische maligniteiten. De microsferen die werden ontwikkeld voor de behandeling van levertumoren werden in 2009 voor het eerst in patiënten toegepast. Sindsdien zijn ruim 80 patiënten behandeld in een fase-1, fase-2 en twee toegepaste klinische studies. (ref. **1-4**) De onderzoeksgroep heeft zich altijd op translationeel onderzoek gericht om ideeën uiteindelijk voor patiënten wereldwijd toegankelijk te maken. De holmium microsferen voor behandeling van levertumoren hebben dit traject doorlopen en worden nu in de markt gezet. Mede op grond van de onderzoeksresultaten die verkregen zijn bij dierexperiment kregen de holmium microsferen op 1 april 2015 een Conformité Européenne (CE) registratie, waardoor ze commercieel verkocht mogen worden in heel Europa.

De eerst ontwikkelde Holmium microsferen zijn de Holmium-PLLA-microsferen. Deze microsferen zijn door M. Smits et al [ref. **4**] in een fase 1 studie (genaamd de HEPAR-1, welke een typische dosisescalatiestudie was en uitgevoerd werd in 15 patiënten) onderzocht op veiligheid bij patiënten met lever metastases. Hierbij is in een oplopende radioactiviteit dosis 166-Holmium-PLLA-microsferen (20, 40, 60 en 80 Gy) via de lever-slagader in de lever geïnjecteerd. Uit deze studie kan worden geconcludeerd dat de toediening van 166-Holmium-PLLA-microsferen veilig toegepast kon worden bij een maximale dosis van 60 Gy over de gehele lever.

De effectiviteit van de Ho-PLLA-microsferen is verder onderzocht in een fase 2 studie (genaamd HEPAR-2, effectiviteitsstudie in 38 patiënten) door J.F. Prince et al [**10**]. Hierbij is het effect van de 166-Holmium-PLLA-embolisatie behandeling op patiënten met lever metastasen beoordeeld. Hiervoor zijn er vooraf "target laesies" aangeduid die in de tijd m.b.v. scans worden gevolgd. Hierbij werd er bij meer dan 70% van de vooraf aangewezen "target laesies" ziektecontrole waargenomen. In deze studie werd een mediale overleving van 14 maanden gevonden, in een vergelijkbare studie met Yttrium microsferen een overleving van 8.8 maanden. De bijwerkingen waren hoofdzakelijk abdominale pijn en moeheid.

Bij de hierboven vermelde toepassing van oncologische maligniteiten worden de ████████ microsferen toegediend door middel van katherisatie, om zo tumoren via de bloedbaan te bereiken. Sinds 2006 wordt er echter ook onderzoek gedaan om ████████ microsferen toe te dienen in tumoren d.m.v. een intra-tumorale injectie.

Om de effectiviteit van de ████████ microsferen te bepalen bij intra-tumorale toediening zijn we een studie gestart met het intra-tumoraal toedienen van ████████ microsferen aan huisdieren met tumoren aan de tong. (plaveiselcelcarcinoom) De diagnose wordt vaak pas laat gesteld, waardoor complete chirurgische verwijdering niet meer mogelijk is. In een studie verband hebben we deze dieren behandeld met een – in een oplopende dosis radioactiviteit - intra-tumorale injecties met ████████ microsferen. De behandeling kon succesvol worden toegepast bij deze veterinaire patiënten. Hierbij werd bij 27% compleet respons gezien, 36% partiële respons, en 18% stabiele ziekte. In deze studie was een duidelijke relatie tussen de toegediende dosis ████████ microsferen en de uitkomst. In eerdere studies met external beam bestraling van deze groep dieren werden er meer complicaties gezien ten opzichte van

deze studie. Article in press [11].

Het succes in deze dierpatiënten heeft daarom ertoe geleid dat de microsferen in 2016 ook humaan zullen worden toegepast bij patiënten met hoofd en hals tumoren.

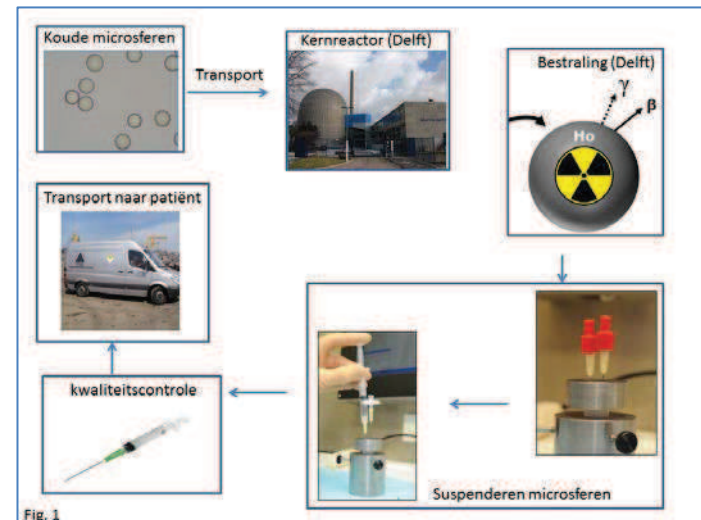
Om de therapie effectiever te maken, willen we kijken naar de mogelijkheden tot het ontwikkelen van [redacted] microsferen die een [redacted] met [redacted] hebben. De nu gebruikte verbinding bevat een [redacted]-content [redacted]. Echter het is ook mogelijk om [redacted] microsferen te maken dit tot wel [redacted] of met een nog hogere belading. Voorbeelden hiervan zijn [redacted] (ref. 5-8) of [redacted] (ref. 9). Echter nieuwe ontwikkelingen zijn gaande. De voordelen van microsferen met een hogere [redacted]-content is dat de deeltjes meer activiteit per deeltje bevatten (hogere specifieke activiteit) en daarmee een hogere dosis kan worden toegediend terwijl het volume suspensie niet groter wordt. Dit heeft ook logistieke voordelen.

De half waarde tijd ( $T_{1/2}$ ) van [redacted] is [redacted]. Het transport van de microsferen en het opwerken voor toediening aan de patiënt kost tijd. Bij een hogere activiteit per microsfeer duurt het langer voordat deze microsferen te ver zijn vervallen, dus is er meer tijd voor transport en opwerken van de microsferen. Het is nu niet altijd mogelijk om de benodigde dosis op tijd bij patiënten te krijgen gezien de afstand tussen reactor, duur van de opwerking en de locatie van het ziekenhuis. (zie fig. 1)

Bij deze studie worden de verschillende formuleringen (microsferen en de gebruikte toedieningsvloeistof) eerst in-vitro uitvoerig getest. Bij de verschillende formuleringen zijn ook verschillende toedieningsvloeistoffen van belang. Immers de verschillende chemische samenstellingen van de microsferen kan een andere samenstelling van een toedieningsvloeistof vereisen. De formuleringen worden dan ook eerst op "[redacted] microsferen" volledig getest: in-vitro op holmiumcontent, oppervlakte, compositie en stabiliteit getest. Daarna op "[redacted] microsferen" [redacted] op specifieke activiteit, stabiliteit na bestralen, oppervlakte en samenstelling na bestralen. Na alle in-vitro onderzoeken zullen er nog ex-vivo experimenten plaats vinden op 'slachtafval-organen' - om de meest optimale combinatie van microsfeer en toedieningsvloeistof te onderzoeken met de daarbij verdeling over organen ( $\mu\text{CT}$ ).

Uiteindelijk zullen de vier meest optimale holmium microsfeer formuleringen uiteindelijk in-vivo verder worden onderzocht op bio-distributie, toxiciteit (niet te verwachten) stabiliteit, lekkage en bio-compatibiliteit in-vivo volgens het hieronder omschreven projectvoorstel.

- [1] J. F. W. Nijsen, B. A. Zonnenberg, J. R. W. Woittiez, D. W. Rook, I. A. S. Woudenberg, and P. P. Van Rijk, "Original article Holmium-166 poly lactic acid microspheres applicable for intra-arterial radionuclide therapy of hepatic malignancies : effects of preparation and neutron activation techniques," vol. 26, no. 7, 1999.
- [2] F. Nijsen, D. Rook, C. Brandt, R. Meijer, H. Dullens, B. Zonnenberg, J. De Klerk, P. Van Rijk, W. Hennink, and F. Van het Schip, "Targeting of liver tumour in rats by selective delivery of holmium-166 loaded microspheres: A biodistribution study," *Eur. J. Nucl. Med.*, vol. 28, pp. 743-749, 2001.
- [3] S. W. Zielhuis, J. F. W. Nijsen, R. de Roos, G. C. Krijger, P. P. van Rijk, W. E. Hennink, and A. D. van het Schip, "Production of GMP-grade radioactive



- holmium loaded poly(L-lactic acid) microspheres for clinical application.*," Int. J. Pharm., vol. 311, no. 1–2, pp. 69–74, Mar. 2006.
- [4] M. L. J. Smits, J. F. W. Nijsen, M. A. A. J. van den Bosch, M. G. E. H. Lam, M. A. D. Vente, W. P. T. M. Mali, A. D. van Het Schip, and B. A. Zonnenberg, "Holmium-166 radioembolisation in patients with unresectable, chemorefractory liver metastases (HEPAR trial): A phase 1, dose-escalation study," *Lancet Oncol.*, vol. 13, pp. 1025–1034, 2012.
- [5] W. Bult, M. A. D. Vente, E. Vandermeulen, I. Gielen, P. R. Seevinck, J. Saunders, A. D. van het Schip, C. J. G. Bakker, G. C. Krijger, K. Peremans, and J. F. W. Nijsen, "Microbrachytherapy using holmium-166 acetylacetonate microspheres: A pilot study in a spontaneous cancer animal model," *Brachytherapy*, vol. 12, pp. 171–177, 2013.
- [6] P. Seevinck, W. Bult, J. Nijsen, M. Vente, R. Roos, A. van het Schip, and C. Bakker, "Highly-loaded holmium microspheres for test dose detection and biodistribution prediction in internal radiation therapy of liver malignancies," in *Proceedings 16th Scientific Meeting, International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, 2008, vol. Toronto, p. 274.
- [7] W. Bult, P. R. Seevinck, G. C. Krijger, T. Visser, L. M. J. Kroon-Batenburg, C. J. G. Bakker, W. E. Hennink, A. D. Van Het Schip, and J. F. W. Nijsen, "Microspheres with ultrahigh holmium content for radioablation of malignancies," *Pharm. Res.*, vol. 26, pp. 1371–1378, 2009.
- [8] W. Bult, R. Varkevisser, F. Soulimani, P. R. Seevinck, H. De Leeuw, C. J. G. Bakker, P. R. Luijten, A. D. Van Het Schip, W. E. Hennink, and J. F. W. Nijsen, "Holmium nanoparticles: Preparation and in vitro characterization of a new device for radioablation of solid malignancies," *Pharm. Res.*, vol. 27, pp. 2205–2212, 2010.
- [9] W. Bult, H. de Leeuw, O. M. Steinebach, M. J. van der Bom, H. T. Wolterbeek, R. M. a Heeren, C. J. G. Bakker, A. D. van Het Schip, W. E. Hennink, and J. F. W. Nijsen, "Radioactive holmium acetylacetonate microspheres for interstitial microbrachytherapy: an in vitro and in vivo stability study.," *Pharm. Res.*, vol. 29, no. 3, pp. 827–36, Mar. 2012.
- [10] Proefschrift J.F.Prince "Holmium radioembolization; efficacy and safety", Chapter 6: "Efficacy of radioembolization with 166-Ho microspheres in lever metastases"; (p92-111) ISBN 978-90-393-6489-5; Feb. 2016. Manuscript in progress.
- [11] S.A. van Nimwegen; R.C. Bakker; J.Kirpensteijn; R.J.J. van Es; R.Koole; M.G.E.H. Lam; J.W.Hesselink; J.F.W. Nijsen; "Intratumoral injection of radioactive Holmium (166Ho) microspheres for effective treatment of oral squamous cell carcinoma in cats". Article submitted, final decision.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het doel van het totale project is de mogelijkheid om formuleringen met ██████████ in-vivo te testen op stabiliteit, biocompatibiliteit, toxiciteit en effectiviteit bij konijnen, ratten en muizen. Hierbij worden de microsferen zowel zonder ██████████ activatie ("████████" als na ██████████ activatie, dus als ██████████ microsfeer ("████████" onderzocht.

Met ██████████ microsferen die een ██████████ hebben, kunnen met een ██████████ per microsfeer met minder injectievolume, maar wel gelijke specifieke geabsorbeerde dosis, toegediend worden. Dit is een groot voordeel voor de patiënt- aangezien de hogere activiteit waarschijnlijk een betere tumor behandeling geeft en ook zorgt voor minder lekkage vanwege het kleinere benodigde volume dat hoeft worden toegediend in de tumor. Daarnaast kan

de hogere [REDACTED] gebruikt worden voor een flexibele logistiek. De half waarde tijd ( $T_{1/2}$ ) van [REDACTED] is [REDACTED]. Het transport van de microsferen en het opwerken voor toediening aan de patiënt kost tijd. Bij een hogere activiteit per microsfeer duurt het langer voordat deze microsferen te ver zijn vervallen, dus is er meer tijd voor transport en opwerken van de microsferen. Het is nu niet altijd mogelijk om de benodigde dosis op tijd bij patiënten te krijgen gezien de afstand tussen reactor, duur van de opwerking en de locatie van het ziekenhuis.

Om dit mogelijk te maken moeten deze nieuw ontwikkelde microsferen worden geoptimaliseerd voor gebruik in-vivo, getest worden op biocompatibiliteit, veiligheid, stabiliteit, verdeling in het tumorweefsel en de effectiviteit op de tumor.

Al het voorgestelde onderzoek zal bij kunnen dragen aan registratie van deze microsferen in het zogenaamde "design History File" dat een belangrijk onderdeel zal vormen van een [REDACTED]. Daarnaast zullen de biocompatibiliteit en effectiviteit een essentieel stuk vormen in de [REDACTED]

---

### 3.3 Belang

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

Als chirurgische verwijdering van maligniteiten geen optie is, blijven alleen radiotherapie en systemische behandelingen over als alternatieve behandelingen. Echter in enkele specifieke gevallen zijn deze opties maar beperkt beschikbaar of hebben ze maar beperkte effect op de overleving. Mogelijkheden zoals intra-tumorale injecties met radioactieve microsferen kunnen dan overwogen worden. Dit is een lokale toediening, waarbij er minder bijwerkingen te verwachten zijn. Echter om deze behandelingstechniek effectiever te maken is er een [REDACTED] microsferen met een [REDACTED] en daarmee een hogere radioactiviteit noodzakelijk. Op grond van deze ervaringen, zowel in veterinaire patiënten als in humane patiënten willen we deze nieuwe [REDACTED] microsferen onderzoeken op biocompatibiliteit, veiligheid, stabiliteit (ook na activatie met neutronen), verdeling over de tumor en de effectiviteit op experimentele tumoren.

---

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Hierbij willen we de volgende onderzoeks-strategie volgen:

**Fase 1:** In-vitro ontwikkeling en testen van nieuwe microsferen en toedieningsvloeistoffen (*al een lopend proces*)

- 5 tot 6 nieuw ontwikkelde [REDACTED] microsferen met een [REDACTED] ontwikkelen en in-vitro / ex-vivo onderzoeken op compositie, stabiliteit en verdeling m.b.v. [REDACTED]
- Deze combineren met verschillende toedieningsvloeistoffen. Immers verschillende microsferen zijn door hun verschillende chemische samenstelling beter of stabiel in een andere vloeistof. Uiteindelijk worden er maximaal vier microsferen verder onderzocht, met ieder twee – voor die microsfeer de meest - optimale toedieningsvloeistoffen.

**Check:** De optimale microsferen zijn microsferen waarbij de microsfeer goed intact blijft na bestraling en opwerken voor gebruik in de patiënt, met betrekking tot de grootte verdeling, uiterlijk, holmiumcontent en release. Hiervoor zijn duidelijke kwaliteitseisen geformuleerd.

**Fase 2:** Microsfeer ██████ in tumoren: (**rat**)

- Bij de stabiele ██████ microsfeer formulering wordt in-vivo getest op de biodistributie bij intra-tumorale toediening ██████
- Als proefdier is gekozen voor de rat omdat hiervoor tumormodellen beschikbaar zijn, waarmee in de onderzoeksgroep ervaring mee is. De tumoren in de rat zijn groot genoeg voor een technisch uitvoerbare lokale injectie van een suspensie van holmium microsferen.
- Als parameter wordt er (kwalitatief en kwantitatief) d.m.v. de ██████ gekeken naar de verdeling van ██████ microsferen.

**Check:** Als blijkt dat de microsferen een goede verdeling over de tumor laten zien, worden deze nieuwe microsferen verder meegenomen voor de bepaling van de optimale dosis en de effectiviteitsstudie. Hierbij wordt verder gegaan met microsfeer formuleringen die zich goed verdelen over de tumor. Microsfeer formuleringen met een slechte verdeling vallen hier af.

**Fase 3:** Optimalisatie behandeling en effectiviteit op de tumor: (**konijn**)

- Hierbij wordt gekeken naar de meest optimale dosis die nodig is voor een goede effect op de tumor. Hierbij wordt een oplopende dosis radioactiviteit over de groepen dieren toegediend. Na injectie vind er een scan plaats om te bepalen ██████ verdeling in de dieren en controle op het eventuele doorschieten naar andere organen. Over de tijd wordt de ██████ distributie gevolgd. De effecten op het tumorweefsel wordt gevolgd tot de tumor een omvang van 4\* begin volume heeft. Bij deze experimenten wordt gebruik gemaakt van de tumor-donor dieren. (zie na de beschrijving fase 4)
- Als proefdier is gekozen voor het konijn omdat hiervan een bekend tumor model beschikbaar is. Daarbij zijn de tumoren groot genoeg om de effectiviteit van de radioactieve microsferen te onderzoeken. In deze fase ligt de nadruk op effectiviteit. Waarbij de dracht van het ██████ is. Dit ██████ kan alleen in goed in een grotere tumoren van ca. ██████ in doorsnede worden getest.
- Als parameter voor effectiviteit wordt gekeken naar een verminderde tumor groei ten opzichte van de controle dieren.

**Check:** Als de microsferen bewezen effectief zijn, en dus een vertraging van de tumorgroei laten zien, wordt er naar de bio compatibiliteit van deze nieuwe microsferen gekeken.

**Fase 4:** bio-compatibiliteit van de microsferen en het supernatant: (**muis**)

- Bepalen ██████ in het dier in een tijdreeks in organen bloed en urine van ██████ microsferen. De microsferen of ██████ wordt ██████. Hierbij kan gebruik gemaakt worden van beeldvorming om de ██████ verdeling terug te vinden.
- Als proefdier is gekozen voor de muis. Dit proefdier wordt ook in de standaard biocompatibiliteitstesten gebruikt wereldwijd. De hoeveelheden ██████ is aangepast aan de grootte van het proefdier.
- Als parameters voor biocompatibiliteit wordt gekeken naar gedrag, uiterlijk van de dieren en ██████. Afwijkend gedrag t.o.v. de blanco geïnjecteerde dieren wordt gescoord.

### **Tumor donordieren:**

Deze dieren worden ingezet zodra fase 2 of 3 gestart wordt, of als andere projecten binnen onze onderzoeksgroep van deze donordieren gebruik gaan maken.

Voor het in vivo in kweek houden van de tumormodellen (zoals VX2 in het Konijn, zoals de R1 in de rat) voor onderdelen uit dit project zijn we genoodzaakt gebruik te maken van donordieren. Dat er voor deze tumorcellen donordieren nodig zijn, is omdat de tumoren gegroeid uit cellen niet direct te gebruiken zijn. De opbouw van de tumor is dan nog niet stabiel en varieert qua groei, vorm en necrotische haard. Pas na opkweek in een (tot twee) passages in het dier krijg je een stabiele goed gevasculariseerde tumor die transplanteerbaar is. Binnen het [REDACTED] zijn er andere onderzoekers die hier mogelijk voor hun onderzoek gebruik van kunnen maken. Dit heeft in het verleden tot vermindering van donor dieren geleid.

De VX2 tumor voor in het konijn is een tumor die al beschreven is in 1935 [12] en wordt gebruikt als tumormodel in de lever, hoofd/hals, pancreas baarmoeder, longen etc. [13-17]. De tumor groeit stabiel, is goed gevasculariseerd en is een alom gebruikt tumor model in het konijn, ook in de beeldvormende onderzoekslijnen. Met deze tumorlijn is veel ervaring binnen de groep. [14, 16]

Voor de ratten zijn er meerdere tumormodellen mogelijk zoals bijvoorbeeld de Nude-rat of WagRij rat met de R1-tumor (rhabdomyosarcoom). Deze is al heel lang in gebruik, is erg stabiel groeit en goed doorbloed is. [17-19]

- [12] P. Rous, J.W. Beard; *“the progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (shope) “*; *J. Exp. Med*, 62; p523-548, 1935.
- [13] M.Nagatsu, T. Okagaki. R.M. Richart and A.Lambert; *Effects of Bleomycin on nuclear DNA in Transplantable VX-2 carcinoma of Rabbit“*; *Cancer Research* 31, 992-996, 1971.
- [14] J.F.W. Nijsen, J.H. Seppenwoolde, T. Havenith, C. Bos, C.J.G. Bakker, A.D. van het Schip; *“Liver tumors; MR imaging of radioactive holmium microspheres – phantom and rabbit study“*; *Radiology* 231, p491-499, 2004.
- [15] A.C. Eifler, R.J.Lewandowski, S.Virmani, J.C. Chung, D.Wang. R.L. Tang. B.Szolc-Kowalska, G.E. Woloschak, G.Y. Yang, P.K. Ryu, R.Salem, A.C. Larson, E. Cheon, M. Strouch, D.J. Bentrem and R.A. Omary; *“Development of the VX2 pancreatic cancer model in rabbits; a platform to test future interventional radiology therapies“*; *J.Vasc Interv. Radil.* 20(8); p1075-1082; 2009.
- [16] W. Bult, H. de Leeuw, O.M. Steinebach, M.J. van der Bom, H.Th. Wolterbeek, R.M.A. Heeren, C.J.G. Bakker, A.D. van het Schip, W.E. Hennik, J.F.W. Nijsen; *“Radioactive Holmium Acetylactonate microspheres for interstitial microbrachytherapy: an in-vitro and in-vivo stability study“*; *Pharm. Res.* 29; p827-836, 2012.
- [17] A. Parvinian, L.C. Casadaban, R.C. Gaba; *“Development, growth, propagation and angiographic utilization of the rabbit VX2 model of liver cancer: a pictorial primer and “how to” guide“*; *Diagn. Interv. Radiology* 20; p 335-340; 2014.
- [18] G.W.Barendsen, J.J.Broerse; *“Experimental Radiotherapy of a Rat Rhabdomyosarcoma with 15 MeV neutrons and 300 kV X-Rays“*; *Eur.J.Cancer* Vol5, p373-391, 1969.
- [19] L.Dubois, W.Landuyt, K.Haustermans, P.Dupont, G.Bormans, P.Vermaelen, P.Flamen, E.Verbeke, L.Mortelmans.; *“Evaluation of hypoxia in an experimental rat tumour model bij [F-18]-Fluoromisonidazole PET and immunohistochemistry“*; *B.J.of Cancer* 91, p1947-1954, 2004.

---

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

---

De volgende dierproef beschrijving wordt gebruikt voor de hierboven beschreven project:

### **01 Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe holmium microsfeer formuleringen voor intratumorale injectie.**

Deze dierproefbeschrijving bestaat uit vier fases:

#### **fase 1:**

in vitro ontwikkeling van nieuwe microsferen; uitgebreid getest in-vitro en ex-vivo

#### **Fase 2:**

Microsfeer distributie van de microsferen over de tumor na intra-tumorale toediening. (zowel [REDACTED] als [REDACTED] microsferen en supernatant/controle)

#### **Fase 3:**

Optimalisatie behandeling en effectiviteit op de tumor.

#### **Fase 4:**

Bio-compatibiliteit van de microsferen en het [REDACTED] door de [REDACTED] uit [REDACTED] microsferen in het dier te onderzoeken (tijdreeks)

---

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

---

Gedurende de afgelopen jaren werden holmium beladen poly-melkzuur microsferen met een gemiddelde diameter van 30 micrometer ontwikkeld en getest in proefdieren, veterinaire patiënten en humane patiënten (bijna 70) en werden deze deeltjes CE gecertificeerd en binnen een bedrijf vercommercialiseerd voor behandeling van patiënten in Europa met levermaligniteiten. Als voorbereiding op deze projectaanvraag zijn [REDACTED] microsferen intra-tumoraal gebruikt bij 40 veterinaire patiënten, met veelbelovende resultaten.

In de beschreven projectaanvraag zullen de nieuw ontwikkelde [REDACTED] microsferen met [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] verder worden getest in vitro, ex-vivo en ook in-vivo om deze verder te ontwikkelen om toe te kunnen passen in de kliniek. Hierbij wordt gekeken naar de [REDACTED] van deze microsferen. Daarnaast naar de verdeling bij intra-tumorale injectie technieken en de werkzaamheid op experimentele tumoren. Het grote voordeel is dat de deeltjes een [REDACTED] hebben waardoor deze een hogere dosis straling kunnen bevatten. Ook wordt er onderzocht of de deeltjes een grotere stabiliteit bezitten als deze tot hoge dosissen worden [REDACTED].



Enkele belangrijke mijlpalen in dit onderzoek:

- **Fase 1:** Stabiele nieuw ontwikkelde microsferen met een optimale toedieningsvloeistof (= formulering) die in-vitro / ex-vivo worden uitgeselecteerd om verder in-vivo verder te onderzoeken om de vertaling naar de kliniek te kunnen maken.
  - GO als formuleringen aan alle eisen voldoet
    - minder dan ██████ release hebben in-vitro
    - meer dan ██████ content hebben op gewicht basis
    - tenminste ██████ van hun volume distributie hebben tussen de beoogde gemiddelde diameter  $\pm$  5 micrometer
    - niet meer dan ██████ beschadigde microsferen na neutronen activatie
- **Fase 2:** Bepalen bio distributie in experimentele tumoren (**rat**).
  - GO
    - als de dosis microsferen voor meer dan ██████ in het tumorvolume aanwezig blijft.
- **Fase 3:** Bepalen effectiviteit op experimentele tumoren (**konijn**)
- → GO
  - als de duur voor de tumor 4\* beginvolume bereikt gemiddeld  $\geq (1.5 - 2) *$  zo lang duurt als zonder behandeling.
- **Fase 4:** Testen stabiliteit en bio compatibiliteit in vivo (**muus**). De formuleringen microsferen en toedieningsvloeistoffen worden verder getest op bio compatibiliteit na toediening van microsfeerbereiding of het supernatant van de bereidingen.

De komende jaren onderzoek bestaan uit optimalisatie. De jaren daarna zullen bestaan uit translatie.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	<b>Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe ██████ microsfeer formuleringen voor intratumorale injectie.</b>
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	

9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.  <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>01</td><td>Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe [REDACTED] microsfeer formuleringen voor intratumorale toediening.</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	01	Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe [REDACTED] microsfeer formuleringen voor intratumorale toediening.
Volgnummer	Type dierproef					
01	Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe [REDACTED] microsfeer formuleringen voor intratumorale toediening.					

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Alvorens de nieuw ontwikkelde [REDACTED] microsferen getransleerd kunnen worden naar de mens zijn enkele dierproeven noodzakelijk. De verschillende microsferen – als formulering in een toedieningsvloeistof - zullen eerst gekarakteriseerd worden volgens de volgende strategie:

**Fase 1:** in-vitro ontwikkeling en testen van nieuwe [REDACTED] microsferen (al een lopend proces)

De vier meest optimale microsferen met de daarbij behorende twee meest optimale toedieningsvloeistoffen per microsfeer worden verder mee genomen naar de in-vivo studie. Totaal [REDACTED].

**Fase 2:** microsfeer distributie over de tumor (**rat**)

- Na tumor implantatie (s.c.) en groei hiervan wordt er intra tumoraal [REDACTED] en [REDACTED] microsferen toegediend. Na de injectie wordt er een [REDACTED] gemaakt om de verdeling en eventuele 'doorschieten' te detecteren. Op een tijdsreeks wordt het dier opgeofferd en worden de tumoren en organen geïsoleerd om ex-vivo verder te analyseren of eerder als het HEP wordt bereikt.

Groepsindeling voor iedere microsfeer:

Maximaal 4 soorten microsferen; onafhankelijk van elkaar uitgevoerd; en twee test toedieningsvloeistoffen per microsfeer; (i.e. ms-A, ms-B, ms-C en ms-D; td-A; td-B) (*ms = microsferen; td = toedieningsvloeistof; [REDACTED]*)

Hierbij zijn per ontwikkelde ms (n=4)

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- Totaal maximaal [REDACTED] groepen per ontwikkelde microsfeer  
( [REDACTED] )

**Fase 3:** effectiviteit van de microsfeer behandeling op de tumorgroei (**konijn**)

- Na tumor implantatie en tumor groei wordt er intra-tumoraal een oplopende dosis radioactiviteit toegediend om het effect op de tumor te bepalen. Na de toediening vindt er beeldvorming plaats om de [REDACTED] distributie te bekijken en te controleren of er geen eventuele lekkage van de activiteit heeft plaats gevonden. Dit kan direct of enkele dagen erna. Gedurende de follow-up wordt de tumorgroei gevolgd en worden er nog meer scans gemaakt om het verloop van de verdeling in beeld te krijgen (Beeldvorming [REDACTED] zichtbaar is). Als de tumor [REDACTED] het begin volume heeft bereikt of het HEP bereikt is wordt het dier getermineerd. Isolatie van tumor en organen voor ex-vivo analyse.

Maximaal 4 soorten microsferen; onafhankelijk van elkaar uitgevoerd; en twee test toedieningsvloeistoffen per microsfeer; (i.e. ms-A, ms-B, ms-C en ms-D; td-A; td-B) (*ms = microsferen; td = toedieningsvloeistof; [REDACTED]*)

Hierbij zijn per ontwikkelde ms (n=4)

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- Totaal maximaal [REDACTED] groepen per ontwikkelde microsfeer  
[REDACTED]

**Fase 4:** Testen biocompatibiliteit in-vivo (**muis**)

Bepalen release van [REDACTED] in een tijdreeks na i.p. toedienen van microsfeer formuleringen, zowel [REDACTED] microsferen als [REDACTED] microsferen. Daarnaast wordt het supernatant van de formuleringen mee genomen. Als formulering wordt gezien de microsfeer (ms) + toedieningsvloeistof (td). Als controle wordt [REDACTED] mee genomen.

Groepsindeling: Voor microsfeer A (maximaal 4 soorten microsferen; onafhankelijk van elkaar uitgevoerd; en twee toedieningsvloeistoffen per microsfeer; allen onafhankelijk van elkaar getest; (i.e. ms-A, ms-B, ms-C en ms-D; td-A; td-B) (*ms = microsferen; td = toedieningsvloeistof; ms-form. = microsfeer formulering; [REDACTED]*))

Hierbij zijn per ontwikkelde ms (n=4)

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- Totaal maximaal [REDACTED] groepen per ontwikkelde microsfeer  
[REDACTED]

Tot maximaal [REDACTED] maal per week wordt er bloed afgenomen (houdend aan de maximale toegestane hoeveelheid (8 ml/kg / 2 wk. )). Ook [REDACTED] [REDACTED] worden gecontroleerd op [REDACTED] content als algemene parameter [REDACTED] in vivo. Op vaste tijdstippen worden de dieren getermineerd – of eerder als het HEP wordt bereikt – en worden de relevante organen geïsoleerd en de biodistributie van [REDACTED] wordt hierin bepaald.

### **Donor dieren (rat en konijn)**

Voor het in vivo in kweek houden van de tumormodellen (zoals VX2 in het Konijn, zoals de R1 in de rat) voor onderdelen uit dit project zijn we genoodzaakt gebruik te maken van donordieren. Dat er voor deze tumorcellen donordieren nodig zijn is omdat de tumoren niet direct uit cellen te gebruiken zijn. De opbouw van de tumor is dan nog niet stabiel en varieert qua groei, vorm en necrotische haard. Pas na opkweek in een (tot twee) passages in het dier krijg je een stabiele goed gevasculariseerde tumor die transplanteerbaar is. Binnen het █████ zijn er mogelijk andere onderzoekers die hier voor hun onderzoek gebruik van kunnen maken. Dit heeft in het verleden tot vermindering van donor dieren heeft geleid.

De VX2 tumor voor in het konijn is een tumor die al beschreven is in 1935 en wordt gebruikt als tumormodel in de lever, hoofd/hals, pancreas baarmoeder, longen etc.. De tumor groeit stabiel, is goed gevasculariseerd en is een alom gebruikt tumor model in het konijn, ook in de beeldvormende onderzoekslijnen. Met deze tumorlijn is veel ervaring binnen de groep.

Voor de ratten zijn er meerdere tumormodellen mogelijk zoals bijvoorbeeld de Nude-rat of WagRij rat met de R1-tumor (rabdomyosarcoom). Deze is al heel lang in gebruik, groeit erg stabiel groeit en is goed doorbloed.

---

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

---

### **Fase 2: microsfeer distributie over de tumor (rat; tumor)**

- Onder anesthesie implantatie van tumorweefsel (zoals bv. De R1 tumor) in de flank<sup>#</sup>. Na tumor groei onder injectie anesthesie intra-tumorale injectie met █████ microsferen of █████ vloeistof gevolgd door een scan (extern). Gedurende de follow up - op indicatie – een extra scan (extern) onder injectie anesthesie. Op een reeks van tijdstippen anesthesie, bloedafname en terminatie<sup>##</sup>. Isolatie van organen en tumoren voor █████ content en verdeling en histologie. (maximaal █ tijdstippen; maximaal tot 21 dagen)

<sup>#</sup> : indien de tumor de eerste implantatie onverhoopt niet aanslaat kan deze procedure een tweede maal geprobeerd worden om zo het aantal dieren niet te hoeven vergroten. Ervaring bij de R1 tumor is dat 95% van de her-implantaties aanslaan.

<sup>##</sup>: of eerder als het dier het Humane Eind Punt (HEP) dreigt te halen

### **Fase 3: Effectiviteit █████ microsfeer behandeling en microsfeer distributie over de tumor. (konijn; tumor)**

- Na preventieve pijnstilling implantatie van tumorweefsel s.c. of i.m. op de achterpoot (of eventueel flank)<sup>#</sup>. Na voldoende tumorgroei transport naar extern, toedienen anesthesie en intra-tumorale injectie met oplopende dosis radioactieve microsferen gevolgd door scan (CT, MRI of echo).

Gedurende de follow-up worden er bloedafnames gedaan (maximaal [REDACTED] en extra scans onder anesthesie (extern; maximaal [REDACTED] Terminatie als de tumor 4\* het begin volume (V0) is of eerder als HEP is bereikt (maximaal 45 dagen na behandeling). Isolatie van de tumor en organen voor ex-vivo analyse. (biodistributie [REDACTED] in de organen, histologie)

# : Voorkeur voor implantatie s.c. echter in voorkomende gevallen slaat de tumor beter aan in de spier (meer bloedvoorziening).

# : indien de tumor de eerste implantatie onverhoopt niet aanslaat kan deze procedure een tweede maal geprobeerd worden om zo het aantal dieren niet te hoeven vergroten. Ervaring bij de VX2 tumor is dat >65% van de her-implantaties aanslaan.

#### **Fase 4:** Testen biocompatibiliteit in-vivo

Bepalen [REDACTED] release in het dier gedurende de tijd (**muis**)

- Onder een roesje worden de microsferen i.p. toegediend.
- Regelmatige controle op welzijn en gedrag gedurende de follow-up. Afwijkend gedrag t.o.v. de blanco geïnjecteerde dieren wordt gescoord.
- Gedurende de follow-up vindt er bloedafname plaats (maximaal [REDACTED] max 8 ml /kg/2wk) en [REDACTED] plaats (bij voorkeur [REDACTED] Terminatie op vaste tijdstippen (maximaal 6\*; tot maximaal 1 jaar na behandeling) waarna de organen voor ex-vivo analyse worden geïsoleerd. (biodistributie [REDACTED] in organen, histologie)

#### **Donor dieren:**

Donor dieren rat:

- Onder anesthesie implantatie van tumorweefsel (zoals bv. De R1 tumor) in de flank#. Na voldoende tumorgroei om als donor te dienen terminatie waarna tumormateriaal wordt geïsoleerd voor implantatie bij nieuwe dieren (nieuwe donor en experimentele dieren).

# : indien de tumor de eerste implantatie onverhoopt niet aanslaat kan deze procedure een tweede maal geprobeerd worden om zo het aantal dieren niet te hoeven vergroten. Ervaring binnen onze groep is dat 95% van de her-implanteerde dieren alsnog een tumor ontwikkelen na een tweede implantatie.

Donor dieren konijn:

- Na preventieve pijnstilling implantatie van tumorweefsel s.c. of i.m. op de achterpoot (of eventueel flank)<sup>#,##</sup>. Na Voldoende tumorgroei om als donor te dienen terminatie waarna tumormateriaal wordt geïsoleerd voor implantatie bij nieuwe dieren (nieuwe donor en experimentele dieren).

# : indien de tumor de eerste implantatie onverhoopt niet aanslaat kan deze procedure een tweede maal geprobeerd worden om zo het aantal dieren niet te hoeven vergroten. Ervaring bij de VX2 tumor is dat > 65% van de her-implantaties aanslaan.

##: Voorkeur voor implantatie s.c. echter in voorkomende gevallen slaat de tumor beter aan in de spier (betere bloedvoorziening).

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

Voordat de microsferen in de [REDACTED] worden getest, wordt eerst de stabiliteit uitvoerig in-vitro en ex-vivo getest. Geselecteerde formuleringen worden pas nadat gebleken is dat de compositie, grootte en stabiliteit en de [REDACTED] lekkage conform de eisen zijn op hun bio-compatibiliteit in vivo getest.

Gebruikte afkortingen:

[REDACTED]; onafhankelijk van elkaar uitgevoerd; en [REDACTED] per microsfeer; allen onafhankelijk van elkaar getest; (i.e. ms-A, ms-B, ms-C en ms-D; td-A; td-B) (ms = microsferen; td = toedieningsvloeistof; ms-form. = microsfeer formulering; [REDACTED]; [REDACTED])

### Fase 2:

De groepsgrootte voor deze fase wordt bepaald volgens Chi<sup>2</sup> variance; distance from constant; one tailed.

Hierbij wordt als uitleesparameter de verdeling van de activiteit over de tumor gebruikt. Doel is [REDACTED] van de tumor met [REDACTED] verdeeld, controle vloeistof wordt [REDACTED] verdeeld (FZ). Effect is dan [REDACTED]. Met een alfa van 5%, power van 80% wordt hier een groepsgrootte van [REDACTED] **dieren per groep** verkregen.

De groepen zijn als volgt gepland:

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- Totaal maximaal [REDACTED] **groepen** per ontwikkelde microsfeer

Totaal komen we dan uit voor iedere ontwikkelde [REDACTED] microsfeer op [REDACTED] = 175 dieren per ontwikkelde microsfeer. Voor alle vier de ontwikkelde microsferen zijn dit maximaal ( 4 \* 175 ) = **700 ratten**.

### Fase 3:

De groepsgrootte voor deze fase wordt bepaald volgens de t-test; difference between slopes; two tailed.



Hierbij wordt als parameter het verschil in tumorgroei tijd tot [redacted] gebruikt. Met een spreiding van [redacted] een alfa van 5% en een power van 80% te verkrijgen komen we uit op **[redacted] dieren per groep**.

De groepen zijn als volgt gepland:

Hierbij zijn per ontwikkelde ms (n=4)

- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- Totaal maximaal **[redacted] groepen** per ontwikkelde microsfeer  
[redacted]

Totaal komen we dan uit voor iedere ontwikkelde [redacted] microsfeer op [redacted] = 49 dieren per ontwikkelde microsfeer. Voor alle vier de ontwikkelde microsferen zijn dit maximaal ( 4 \* 49 ) = **196 konijnen**.

#### Fase 4:

De groepsgrootte voor deze fase wordt bepaald volgens de t-test; difference between slopes; two tailed.

Hierbij wordt als parameter het verschil in de negatieve effecten op de omliggende organen bepaald (Ho content; histologie). We hopen hier geen effect te vinden tussen de controles en de behandelde dieren. Een effect van [redacted] een alfa van 5% en een power van 90% te verkrijgen komen we uit op **[redacted] dieren per groep**. De gekozen power is hoger dan in fase 2 en 3 daar in deze fase de eerste onderzoeken voor veiligheid op langere termijn worden onderzocht.

De groepen zijn als volgt gepland:

- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- Totaal maximaal **[redacted] groepen** per ontwikkelde microsfeer  
[redacted]

Totaal komen we dan uit voor iedere ontwikkelde [redacted] microsfeer op [redacted] = 300 dieren per ontwikkelde microsfeer. Voor alle vier de ontwikkelde microsferen zijn dit maximaal ( 4 \* 300 ) = **1200 muizen**.

**Donoren:**

Dit zijn dieren die dienen als tumordonor voor de experimentele dieren die in de komende jaren worden ingezet. Als er een periode is waarbij geen tumor gebruikt wordt worden er ook geen donor dieren ingezet. Binnen het [REDACTED] zijn er andere onderzoekers die hier mogelijk voor hun onderzoek gebruik van kunnen maken. Dit heeft in het verleden tot vermindering van donor dieren heeft geleid.

Voor zowel de rat als voor het konijn geldt:

- Per implantatie worden twee dieren ingezet als donor
- Tumor groei duurt 3-4 weken voor deze geoogst kan worden.
- Per jaar betekend dit 13 tot 17 maal overzetten (gem. 15)
- Totaal over 5 jaar: 5 jaar \* 15 maal \* 2 dieren = 150 dieren.

Totaal **maximaal 150 ratten over 5 jaar**

Totaal **maximaal 150 konijnen over 5 jaar**

---

**B. De dieren**

---

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

---

**Fase 2:**

Voor de ratten zijn er meerdere tumormodellen mogelijk zoals bijvoorbeeld de Nude-rat of WagRij rat met de R1-tumor (rhabdomyosaroom). Deze is al heel lang in gebruik, is erg stabiel groeit en goed doorbloed is.

Als proefdier is gekozen voor de rat omdat hiervan meerdere tumormodellen beschikbaar zijn, zoals bv. De R1 tumor in de Nude-rat of WagRij rat. Deze tumoren zijn groot genoeg voor een technisch uitvoerbare lokale injectie van een suspensie van [REDACTED] microsferen.

De dieren worden betrokken van een officiële leverancier in de EU, leeftijd van 6-8 weken. Op deze leeftijd is er voldoende "body" om de behandeling te kunnen verdagen; In verband met de [REDACTED] die wordt uitgevoerd na de behandeling met de [REDACTED] microsferen is de voorkeur voor vrouwelijke dieren. De mannelijke nude-ratten zijn al gauw te groot om met de  $\mu$ CT te kunnen worden gescand. Vrouwelijke dieren van ca. 11-12 weken wegen ca. 200 gram; mannelijke dieren zijn dan al 350 gram. Maximaal 4 \* 175 dieren

**Fase 3:**

Als proefdier is gekozen voor het konijn omdat hiervan een bekend tumor model beschikbaar is. Daarbij zijn de tumoren groot genoeg om de effectiviteit van de radioactieve microsferen te onderzoeken. In deze fase ligt de nadruk op effectiviteit. Waarbij de dracht van het [REDACTED] maximaal 9 mm is. Dit aspect kan alleen in goed in een grotere tumoren van ca. 1.5 cm in doorsnede worden getest.

Hierbij wordt gebruik gemaakt van New Zealand White konijnen van een officiële leverancier in de EU; 8-10 weken; ca. 2.5-3.5 kg (*kunnen tumoren, zoals het VX2 tumor model, goed aan en ondervinden hier niet veel ongerief van*); Bij voorkeur vrouwelijke dieren. Dit i.v.m. groepshuisvesting, wat bij mannelijke dieren niet mogelijk is. Daarnaast is er bij mannelijke dieren risico op sproeien, wat met de radioactiviteit niet gewenst is i.v.m. veiligheid van medewerkers. Maximaal 4 \* 49 dieren

#### **Fase 4:**

Als proefdier is gekozen voor de muis. Dit proefdier wordt ook in de standaard biocompatibiliteitstesten gebruikt wereldwijd. De hoeveelheden microsfeer suspensie en/of supernatant is aangepast aan de grootte van het proefdier. Hierbij wordt gebruik gemaakt van muizen, zoals de Balb/C van 4-6 weken. Betrokken van een officiële leverancier binnen de EU; Hierbij is de voorkeur voor vrouwelijke dieren, gezien de lange follow-up. Mannelijke dieren zijn niet in groepshuisvesting te huisvesten. Maximaal 4 \* 300 dieren.

#### **Donoren:**

Rat:

Hierbij wordt gebruik gemaakt van ratten, zoals de Nude rat of de WagRij, van 6-8 weken (voldoende "body" om de behandeling te kunnen verdragen. De dieren worden betrokken van een officiële leverancier in de EU; Net als bij de experimenten wordt gekozen voor vrouwelijke dieren in verband met vergelijkbare tumorgroei. Maximaal 150 dieren.

Konijn:

Hierbij wordt gebruik gemaakt van New Zealand White konijnen van een erkende leverancier binnen de EU; 8-10 weken; ca. 2.5-3.5 kg (*kunnen tumoren, zoals het VX2 tumor model, goed aan en ondervinden hier niet veel ongerief van*); Net als bij de experimenten wordt gekozen voor vrouwelijke dieren in verband met vergelijkbare tumorgroei. Maximaal 150 dieren

---

### **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

Als de surplus dieren van de goede stam zijn, niet te oud zijn en naief zijn

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

Nee

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

Ernstig ongerief is niet te verwachten, daar er al verschillende ████████-microsferen al in het dier (veterinair) of in de mens wordt toegepast. Ook hierin is ████████ en ████████ aanwezig. Voor translatie naar de mens is het wel nodig om dit in vivo te onderzoeken

---

### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

---

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

---

**Vervanging:**

Er wordt als eerste vele testen in-vitro / ex-vivo uitgevoerd om de veiligheid voor het dier zo hoog mogelijk te houden. Om de translatie naar de mens mogelijk te maken is het nodig om de microsferen in een heel organisme te testen. Hierdoor is het gebruik van dieren niet te voorkomen.

**Vermindering:**

Door statistische berekeningen worden er voldoende dieren per groep genomen om voldoende zekerheid te hebben van wat er uit de experimenten komt, zodat dit voldoende zou zijn om goede conclusies te kunnen trekken uit de resultaten.

**Verfijning:**

De dieren worden regelmatig gecontroleerd en waar nodig wordt pijnstilling toegepast of wordt het dier geëuthanaseerd als het humane eindpunt dreigt te worden bereikt. (wat niet te verwachten is).

Al het voorgestelde onderzoek zal gebruikt kunnen worden voor de registratie van deze microsferen in het zogenaamde "██████████" dat een belangrijk onderdeel zal vormen ██████████. Daarnaast zullen de biocompatibiliteit en effectiviteit een essentieel stuk vormen in de ██████████ ██████████ om de translatie naar - en toepassing bij - de patiënt mogelijk te maken.

---

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

---

Gevoelige/pijnlijke handelingen worden uitgevoerd onder een lichte verdoving of anesthesie; in overleg met de IvD. Daarnaast worden de dieren goed gecontroleerd en getraind op handelen. Dit zorgt ervoor de dieren het uitvoeren van de controles niet als stress-vol ervaren.

---

## **Herhaling en duplicering**

### **E. Herhaling**

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

---

n.v.t.

---

## **Huisvesting en verzorging**

### **F. Huisvesting en verzorging**

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

---

Nee

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

### **G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest**

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## **Ongeriefinschatting/humane eindpunten**

### **H. Pijn en pijnbestrijding**

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

### **I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen**

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

A: Er zou irritatie ten gevolge van de nieuw ontwikkelde ████████ microsferen kunnen ontstaan. Hiervoor worden de dieren ook regelmatig gecontroleerd op algemene welzijnskenmerken (Gedrag, houding, verzorging, uiterlijk en sociale activiteiten) om dit voor te zijn.

B: Een paar groepen zullen de leeftijd van 1 jaar overschrijden en zouden daar ongerief van kunnen ondervinden. Voor de muizen (fase 4) is dit 17% van de dieren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

A: Lekkage van bestanddelen van de microsfeer of irritatie toedieningsvloeistof.

B: ouderdom

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

Uitgebreide in-vitro testen vooraf; regelmatige diercontroles gedurende het experiment

#### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Fase 2: rat - HEP: tumorvolume  $\geq 10\%$  van het lichaamsgewicht; ulceratie van de tumor; gewichtsverlies (20% t.o.v. begin; 15% binnen 2-3 dagen); verminderde (>1 dag) of afwezige activiteit; klinische verschijnselen die duiden op ongewenst ongerief.

Fase 3: konijn - HEP: tumorvolume  $\geq 10\%$  van het lichaamsgewicht; ulceratie van de tumor; klinische verschijnselen die duiden op ongewenst ongerief.

Fase 4: muis - HEP: gewichtsverlies (20% t.o.v. begin; 15% binnen 2-3 dagen); verminderde (>1 dag) of afwezige activiteit; klinische verschijnselen die duiden op ongewenst ongerief.

We verwachten van de microsferen en toedieningsvloeistof zelf geen omstandigheden die humane eindpunt zouden opleveren. Zodra dit wel het geval zou zijn zal - eventueel in overleg met de dierenarts - het dier worden getermineerd.

De dieren die gedurende 12 maanden gevolgd worden worden ouder dan 1 jaar. Het is bekend dat spontane tumoren door veroudering kunnen ontstaan. Zodra dit welzijnsaantasting betekent is dit direct een reden voor euthanasie.

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

<1% mbt het beschreven protocol;

27% van de dieren binnen fase 4 worden ouder dan 1 jaar en zouden daar nadeel aan kunnen ondervinden.

#### **K. Classificatie van ongerief**

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

Fase 2:

Onder narcose/roesje tumor implantatie; tumorgroei; ████████ microsfeer injectie onder narcose + scan; follow-up met regelmatige controle; doden en isolatie bloed en organen voor ex-vivo analyse. Totale ongerief zal matig zijn.

Fase 3:

Na pijnstilling tumor implantatie; tumorgroei; ████████ microsfeer injectie onder narcose; scan onder narcose; follow up met scans onder narcose;

regelmatige welzijnscontrole; doden en isolatie van organen voor ex-vivo analyse. Totale ongerief zal matig zijn.

Fase 4:

injectie microsferen onder roesje; regelmatige welzijnscontrole; bloed/urine verzamelen; doden op vaste tijdstippen; isolatie organen voor ex-vivo analyse. Totale ongerief zal matig zijn.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Isolatie van relevante organen voor Ex-vivo analyse (■■■■■■ content en histologie).

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

### **A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2017.II.504.002
2. Titel van het project : Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe [REDACTED] microsfeer formuleringen voor intratumorale injectie
3. Titel van de NTS : Ontwikkeling van [REDACTED] bolletjes voor behandeling van tumoren

#### 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
- wijziging van vergunning met nummer :

#### 5. Contactgegevens DEC

- Naam DEC : DEC Utrecht
- Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247
- Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ontvangen door DEC: 01-03-2017
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 15-03-2017
- anderszins behandeld:
- termijnonderbreking(en) van / tot : 20-03-2017/06-04-2017 en 10-04-2017/24-04-2017
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 26-04-2017

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

#### 8. Eventueel horen van aanvrager

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

#### 9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 20-03-2017
- Datum antwoord: 06-04-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:



## Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: U geeft aan dat het traject eerder al succesvol was. Kunt u iets van de resultaten van de klinische studie laten zien? Ook zou de DEC graag iets meer lezen over de tot nu toe behaalde resultaten intratumoraal.

*De eerst ontwikkelde Holmium microsferen zijn de Holmium-PLLA-microsferen. Deze microsferen zijn door M. Smits et al [ref. 4] in een fase 1 studie (genaamd de HEPAR-1, welke een typische dosisescalatiestudie was en uitgevoerd werd in 15 patiënten) onderzocht op veiligheid bij patiënten met lever metastases. Hierbij is in een oplopende radioactiviteit dosis 166-Holmium-PLLA-microsferen (20, 40, 60 en 80 Gy) via de lever-slagader in de lever geïnjecteerd. Uit deze studie kan worden geconcludeerd dat de toediening van 166-Holmium-PLLA-microsferen veilig toegepast kon worden bij een maximale dosis van 60 Gy over de gehele lever.*

*De effectiviteit van de Ho-PLLA-microsferen is verder onderzocht in een fase 2 studie (genaamd HEPAR-2, effectiviteitsstudie in 38 patiënten) door J.F. Prince et al [10]. Hierbij is het effect van de 166-Holmium-PLLA-embolisatie behandeling op patiënten met lever metastasen beoordeeld. Hiervoor zijn er vooraf "target laesies" aangeduid die in de tijd m.b.v. scans worden gevolgd. Hierbij werd er bij meer dan 70% van de vooraf aangewezen "target laesies" ziektecontrole waargenomen. In deze studie werd een mediale overleving van 14 maanden gevonden, in een vergelijkbare studie met Yttrium microsferen een overleving van 8.8 maanden. De bijwerkingen waren hoofdzakelijk abdominale pijn en moeheid.*

*Bij de hierboven vermelde toepassing van oncologische maligniteiten worden de holmium microsferen toegediend door middel van katherisatie, om zo tumoren via de bloedbaan te bereiken. Sinds 2006 wordt er echter ook onderzoek gedaan om ██████████ microsferen toe te dienen in tumoren d.m.v. een intra-tumorale injectie.*

*Om de effectiviteit van de ██████████ microsferen te bepalen bij intra-tumorale toediening zijn we een studie gestart met het intra-tumoraal toedienen van ██████████ microsferen aan huisdieren met tumoren aan de tong. (plaveiselcelcarcinoom) De diagnose wordt vaak pas laat gesteld, waardoor complete chirurgische verwijdering niet meer mogelijk is. In een studie verband hebben we deze dieren behandeld met een – in een oplopende dosis radioactiviteit - intra-tumorale injecties met ██████████ microsferen. De behandeling kon succesvol worden toegepast bij deze veterinaire patiënten. Hierbij werd bij 27% compleet respons gezien, 36% partiële respons, en 18% stabiele ziekte. In deze studie was een duidelijke relatie tussen de toegediende dosis ██████████ microsferen en de uitkomst. In eerdere studies met external beam bestraling van deze groep dieren werden er meer complicaties gezien ten opzichte van deze studie.*

- 3.4 Onderzoeksstrategie: Het is de DEC niet helder waarom in fase 2, 3 en 4 zoveel verschillende vormen van microsferen (zowel ██████████) gebruikt worden. En wat is de toegevoegde waarde van het gebruik van de zowel koude als afgekoelde microsferen; waarom werkt u niet alleen met afgekoelde materialen? Dat scheelt behoorlijk in het aantal dieren. Graag verhelderen.

Er wordt voor de fase 2 en fase 4 gebruik gemaakt van [REDACTED] microsferen en [REDACTED] of [REDACTED] microsferen. Bij toediening van [REDACTED] microsferen wordt naar de effecten van de microsferen voor [REDACTED] gekeken. De [REDACTED] microsferen worden ook als controle meegenomen. Hierbij zijn de effecten die worden gevonden tegen gevolge van de mogelijke chemische reactie van de microsferen met het lichaam/tumor zoals ze geproduceerd worden. Na [REDACTED] activatie ([REDACTED]) wordt gekeken naar de eventuele effecten hier bovenop ten gevolge van deze [REDACTED] activatie. Het zou mogelijk kunnen zijn dat de microsferen hierdoor [REDACTED] en dus een ander [REDACTED] activatie.

We gebruiken therapeutische ([REDACTED] microsferen, om met name het effect van de activiteit te onderzoeken. In sommige gevallen is echter het effect (bijvoorbeeld bij acute experimenten) minder belangrijk, en is vooral de distributie van de microsferen belangrijk welke zich o.a. goed laat meten met [REDACTED] microsferen. Ook vanuit wettelijk aspect moet er gewerkt worden met zo laag mogelijke activiteit waar dat mogelijk is.

Voor fase 3 worden de dieren behandeld met controle – [REDACTED] - microsferen en [REDACTED] verschillende dosissen radioactieve microsferen. Totaal dus [REDACTED] microsferen om de effectiviteit te testen van de behandeling op de tumorgroei. Hierin zijn de [REDACTED] microsferen de controle en wordt er een dosisafhankelijkheid getest gelieerd aan de effectiviteit.

#### Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: In de bijlage wordt niet genoemd dat er in fase 4 ook naar gedrag wordt gekeken, wat wel genoemd staat in de strategie van het projectvoorstel. Graag verhelderen/wijzigen.  
*Dit is inderdaad een onderdeel van de te scoren parameters, dit is in de bijlage aangepast*  
*Toegevoegd: Regelmatige controle op welzijn en gedrag gedurende de follow-up. Afwijkend gedrag t.o.v. de blanco geïnjecteerde dieren wordt gescoord.*
- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC vraagt zich af of de organen ook histopathologisch beoordeeld worden?  
*Dit is zeker een goede optie. De organen worden na terminatie geïsoleerd en eventueel direct voor histologie gebruikt of opgeslagen in de -80°C vriezer, voor de [REDACTED] als ook voor andere analyses uit te voeren. Histologie van de weefsels zal onderdeel zijn van het onderzoek en is als zodanig toegevoegd aan het protocol.*
- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC gaat ervan uit dat u niet meer dan twee keer een tumorinoculatie doet. Klopt dat?  
*De implantatie wordt normaal eenmalig uitgevoerd. Als dit – om wat voor rede dan ook - niet aanslaat wordt deze handeling eenmalig herhaald. Mochten er duidelijke redenen zijn dat maakt dat er geen tumor is aangeslagen in een specifiek dier zou dit in overleg met - en met toestemming van - de IvD besloten kunnen worden om dit een derde maal te proberen.*
- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Volgens de DEC dient het aantal dieren bij fase 4 4 x 175 in plaats van 4 x 196 te zijn. Graag wijzigen.

Hier kan ik u helaas niet helemaal volgen; Hieronder de dieraantallen nogmaals verder uitgeschreven:

Voor fase vier: (muis)

Deze fase bestaat uit de volgende [redacted] per microsfeer:

- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]

Er zijn [redacted] met [redacted] per groep → geeft 300 dieren per microsfeer. Totaal voor 4 ontwikkelde microsferen zou dit maximaal  $4 * 300 = 1200$  dieren betekenen.

Voor Fase 3: (konijn)

Deze fase bestaat uit de volgende 7 groepen per microsfeer:

- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]

Hierbij wordt de effectiviteit op de tumorgroei bepaald. Totaal dus [redacted], [redacted] [redacted]. Totaal voor 4 ontwikkelde microsfeer zou dit maximaal  $4 * 49 = 196$  dieren betekenen.

Voor Fase 2: (rat)

Deze fase bestaat uit de volgende [redacted] per microsfeer:

- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted] zout

Hierbij zijn er [redacted] ontwikkelde microsfeer. Totaal voor 4 ontwikkelde microsfeer zou dit maximaal  $4 * 175 = 700$  dieren betekenen.

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters, beschrijving beoogde behandeling van de dieren en onderbouwing gekozen aanpak: Hier wordt bij fase 4 gesproken over een deel a, wat de suggestie geeft dat er dan ook een deel b is, maar dat staat niet genoemd. Vervolgens wordt bij I (overige aantasting van het welzijn en maatregelen) gesproken over fase 4-1 en fase 4-2. Wordt hiermee deel a en deel b bedoeld? Zo ja, dan mist deel b bij de beschrijving van de beoogde behandeling en zou het helderder zijn als bij I dezelfde benaming wordt gebruikt.  
*Dit is inderdaad het geval, excuus voor de verwarring. Het was in de eerste opzet de bedoeling, maar na intern overleg is hiervan afgezien. Fase 4 bestaat uit een deel. De overige vermeldingen voor fase a / b (1 / 2) zijn verwijderd.*
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

#### Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 10-04-2017
- Datum antwoord: 24-04-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:
  - M.b.t. de vraag over het gebruik van [REDACTED] geeft u aan dat 'de microsferen hierdoor [REDACTED] en dus een ander bio-compatibiliteit hebben dan zonder deze [REDACTED]'. Dat is juist de reden dat de DEC het nut van het gebruik van [REDACTED] microsferen betwijfelt. [REDACTED] microsferen zullen niet in patiënten toegepast worden, dus waarom zouden eigenschappen en effecten van deze microsferen in kaart gebracht moeten worden? Graag nader uitleggen/motiveren.  
*De gedachte achter het gebruik van de [REDACTED] microsferen om deze te gebruiken als controle: We willen de [REDACTED] microsferen meenemen om aan te tonen (evt. uit te sluiten) dat de microsferen na [REDACTED] stabiel zijn en gelijk reageren als de [REDACTED] microsferen. (= Controle groep). Immers de microsferen ondergaan door de [REDACTED] grote veranderingen in [REDACTED]. Om te onderzoeken of deze [REDACTED] heeft moeten we deze vergelijken met de juiste controle, namelijk [REDACTED] microsferen.*
  - M.b.t. de aantallen: heeft de DEC niet helemaal de juiste vraag gesteld, waarvoor excuses. De vraag van de DEC had niet betrekking op bijlage 4, maar op bijlage 2. In de bijlage dierproeven onder B (op p. 8 van 13) staat dat maximaal 4 x 196 dieren nodig zijn, maar hier moet staan 4 x 175.  
*Deze inconsistentie is aangepast.*
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

- Datum expert advies:
- Advies expert:

### **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

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

### **C. Beoordeling (inhoud):**

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. De aanvraag heeft een concreet doel, dat is opgesplitst in een viertal fases (fase 1 valt niet onder de wod), en kan getypeerd worden als een project. De aanvrager heeft duidelijk beschreven dat de uitkomst van fase 2 van belang is voor fase 3 en de uitkomst van fase 3 voor fase 4 en dat de opzet derhalve sequentieel is. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Handreiking Invulling Definitie Project'. Het is helder welke handelingen de individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondervinden. De DEC is er om die reden van overtuigd dat de het project toetsbaar is.
2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling.

#### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van het project is om de stabiliteit, biocompatibiliteit, toxiciteit en effectiviteit van formuleringen met ██████████ in-vivo te bepalen. Het uiteindelijke doel van het project is het om nieuwe ██████████ microsfeer formuleringen, met een ██████████ concentratie, intratumoraal toe te dienen. Omdat tumoren niet altijd operatief verwijderd kunnen worden en radiotherapie en systemische behandelingen soms beperkt beschikbaar zijn of maar een beperkt effect hebben, zijn door de onderzoeksgroep radioactieve ██████████ ontwikkeld welke worden toegediend middels katherisatie, om zo tumoren via de bloedbaan te bereiken. Sinds ██████████ worden deze ██████████-bolletjes ook intra-tumoraal geïnjecteerd. Om deze behandelingstechniek effectiever te maken wil men microsferen ontwikkelen met een ██████████ concentratie. Voordeel hiervan is dat een hogere dosis kan worden toegediend terwijl het volume suspensie niet groter wordt. Voordat een hogere ██████████ concentratie toegepast kan worden dient de veiligheid en het precieze behandelingseffect in kaart te worden gebracht. De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, de onderzoekers en de (toekomstige) patiënt.  
De eerste belanghebbenden zijn (toekomstige) kankerpatiënten. Door het bepalen van de veiligheid en het behandelingseffect van ██████████ microsferen kan op termijn een betere therapie voor de behandeling van tumoren worden toegepast. De morele waarden die derhalve worden bevorderd zijn: welzijn en rechtvaardigheid. Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ervaren. De dieren zullen in het kader van het onderzoek gedood worden. Voor het onderzoeksveld geldt dat dit project kan bijdragen aan een goede wetenschappelijke reputatie en kan leiden tot nieuwe wetenschappelijke inzichten. Wetenschappelijke reputatie kan door het onderzoeksveld van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren.
6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. De onderzoeksgroep houdt zich al sinds 1994 bezig met de ontwikkeling van radioactieve holmium-bolletjes en humane toepassing daarvan. Om die reden is de DEC ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De DEC is er bovendien van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project zal kunnen en blijven voldoen aan de 3V-beginselen om te voorkomen dat teveel proefdieren zullen worden ingezet en dat ze onnodig nadeel zullen ondervinden van de experimenten.
8. Het projectvoorstel bestaat uit één bijlage, welke is opgedeeld in 4 fases van onderzoek. Fase 1 behelst het in-vitro ontwikkelen en testen van nieuwe microsferen en toedieningsvloeistoffen met celkweken en slachtafval en valt derhalve niet onder de reikwijdte van de Wet op de dierproeven. Het feitelijke dierexperimenteel onderzoek start bij fase 2, waarin de microsfeer distributie in tumoren bij intra-tumorale toediening wordt getest in ratten. Als blijkt dat de microsferen een goede verdeling over de tumor laten zien, worden de nieuwe microsferen verder meegenomen voor bepaling van de optimale dosis en effectiviteit op de tumor in fase 3. Hiervoor worden konijnen gebruikt. Wanneer de microsferen bewezen effectief zijn, en dus een vertraging van de tumorgroei laten zien, wordt er in fase 4 in muizen naar de biocompatibiliteit van deze nieuwe microsferen gekeken. De verschillende fases gelden als go/no-go moment. Naast de verschillende fases van onderzoek wordt in bijlage 1 ook het gebruik van het in vivo in kweek houden van de tumormodellen met behulp van donordieren beschreven. Deze donordieren worden ingezet in fase 2 en 3. De DEC is van mening dat het project goed doordacht is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en

helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat verwacht mag worden dat de doelstellingen van het project behaald zullen worden.

#### *Welzijn dieren*

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:

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

Surplus dieren kunnen gebruikt worden indien ze beschikbaar, van de juiste stam, niet te oud en naïef zijn.

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.

11. Het ongerief is voor alle dieren ingeschat als matig. De dieren in fase 2 en 3 worden diverse malen onder narcose gebracht voor het implanteren van de tumor, de intra-tumorale injectie en de imaging. In fase 4 krijgen de dieren tijdens een roesje de microsferen i.p. toegediend en wordt maximaal 5 keer bloed afgenomen en urine bemonsterd. De donordieren krijgen onder anesthesie (rat) of middels een s.c. of i.m. injectie (konijn) tumorweefsel geïmplanterd. Na afloop van de experimenten worden de dieren gedood. Gezien deze handelingen is de DEC van mening dat het genoemde ongerief een realistische inschatting is.

12. De integriteit van de dieren wordt fysiek aangetast als gevolg van geïnduceerde tumorgroei en verschillende experimentele handelingen, zoals chirurgie, intra-tumorale injecties, imaging en bloedafnamen.

13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. De aanvrager heeft, per fase duidelijk weergegeven wat de humane eindpunten zijn. Het maximale tumorvolume is vastgesteld op 10% van het lichaamsgewicht (fase 2 en 3). Van de microsferen en de toedieningsvloeistof wordt geen ongerief verwacht dat tot een humaan eindpunt zou kunnen leiden. De dieren die in fase 4 12 maanden lang gevolgd worden kunnen mogelijk spontane tumoren krijgen door ouderdom. De verwachting is dat 27% van deze dieren om die

reden het humane eindpunt bereikt. Van de overige dieren in het projectvoorstel wordt verwacht dat <1% het humane eindpunt bereikt.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Voordat gestart wordt met de dierproeven worden in fase 1 de nieuwe microsferen en toedieningsvloeistoffen in vitro ontwikkeld en getest met celkweken en slachtafval. Op die manier wordt voorkomen dat er speciaal voor dit deel van het onderzoek dieren gedood moeten worden. Om een volledig beeld te krijgen van de stabiliteit, biocompatibiliteit, toxiciteit en effectiviteit van formuleringen met [REDACTED] zijn echter levende dieren nodig. Dit is ook noodzakelijk voor de registratie van de microsferen in het zogenaamde "[REDACTED]" dat een belangrijk onderdeel zal vormen van een [REDACTED] [REDACTED]. Daarnaast zullen de biocompatibiliteit en effectiviteit een essentieel onderdeel vormen in de [REDACTED] [REDACTED] - en toepassing bij - de patiënt mogelijk te maken.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Voor de berekening van het aantal benodigde dieren zijn statistische methoden toegepast. Onnodig proefdiergebruik wordt voorkomen met behulp van heldere go/no-go momenten.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De experimentele handelingen vinden plaats onder verdoving en er worden adequate humane eindpunten toegepast. De tumoren worden zo klein mogelijk gehouden. De dieren worden hiertoe nauwlettend geobserveerd, zodat tijdig geconstateerd wordt wanneer een dier het humaan eindpunt bereikt, en ernstig ongerief voorkomen wordt. Voor iedere fase worden verschillende proefdieren gebruikt. In fase 2 is gekozen voor de rat omdat de onderzoeksgroep reeds ervaring heeft met de hiervoor beschikbare tumormodellen. Daarnaast zijn de tumoren in de rat groot genoeg voor een technisch uitvoerbare lokale injectie met een suspensie van [REDACTED] microsferen. In fase 3 wordt gewerkt met konijnen omdat hiervan een bekend tumormodel beschikbaar is. Omdat in deze fase de nadruk ligt op de effectiviteit van de radioactieve microsferen en de dracht van [REDACTED] is, kan dit aspect alleen goed in grotere tumoren van [REDACTED] cm in doorsnede worden getest. In de laatste fase is gekozen voor de muis omdat dit het wereldwijde standaardmodel voor biocompatibiliteitstesten is. Voor de donordieren worden – logischerwijs - ratten (fase 2) en konijnen (fase 3) gebruikt.
17. Voor zover bij de DEC bekend, is er geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.



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

18. Er zullen in de bijlage, bij voorkeur, alleen vrouwelijke dieren gebruikt worden. Omdat mannelijke nude-ratten al gauw te groot zijn om in de  $\mu$ CT te kunnen worden gescand, gaat de voorkeur in fase 2 uit naar vrouwelijke dieren van ca. 11-12 weken en ca. 200 gram. In fase 3 gaat de voorkeur uit naar vrouwelijke konijnen omdat groepshuisvesting bij mannelijke konijnen niet mogelijk is. Daarnaast bestaat er bij mannelijke konijnen het risico op sproeien, wat met de radioactiviteit niet gewenst is i.v.m. de veiligheid van medewerkers. In fase 4 gaat de voorkeur eveneens uit naar vrouwelijke dieren (muizen), gezien de lange follow-up. Mannelijke dieren zijn niet in groepshuisvesting te huisvesten. Voor de donordieren (zowel rat als konijn) wordt net als bij de experimenten gekozen voor vrouwelijke dieren in verband met vergelijkbare tumorgroei. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken, noodzakelijk is om de proeven met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood, omdat het voor het behalen van de doelstelling noodzakelijk is relevante organen te isoleren voor histologie, ex vivo analyse en voor het bepalen van de biodistributie van ██████████. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood.
20. Omdat in het projectvoorstel muizen, ratten en konijnen worden aangevraagd is de vraag over herplaatsing/hergebruik niet van toepassing.

### *NTS*

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

### **D. Ethische afweging**

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het in kaart brengen van de stabiliteit, biocompatibiliteit, toxiciteit en effectiviteit van formuleringen met ██████████, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.
2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met matig ongerief. Daar staat tegenover dat er met dit onderzoek belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten kunnen worden verworven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe. Kanker is helaas nog steeds een veel voorkomende aandoening waarvoor niet altijd goede behandelmogelijkheden zijn, met als gevolg dat een groot aantal patiënten komen te overlijden. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project inzicht geven in de veiligheid en het behandel-effect, wat – bij een positieve uitslag – ertoe kan leiden dat

tumoren voortaan lokaal en met een [REDACTED] behandeld kunnen worden. Dit is een groot voordeel voor de patiënt aangezien verwacht wordt dat de hogere activiteit en intra-tumorale toediening zorgen voor een betere tumorbehandeling [REDACTED] vanwege het kleinere benodigde volume dat hoeft te worden toegediend in de tumor. De DEC kent daar ook veel gewicht aan toe.

Het is aannemelijk dat de fundamenteel-translatieele doelstelling behaald zal worden.

Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het bepalen van de stabiliteit, biocompatibiliteit, toxiciteit en effectiviteit van formuleringen met [REDACTED] een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit substantiële belang opweegt tegen de aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

#### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

[Redacted]

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD1150020171632

**Bijlagen**

2

Datum 2 mei 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 mei 2017. Het gaat om uw project "Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe holmium microsfeer formuleringen voor intratumorale injectie". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1150020171632. 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:**

2 mei 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1150020171632

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**  
2 mei 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020171632

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500  
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 30244197  
Postbus: 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
IBAN: NL27INGB0000425267  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

**Datum:**  
2 mei 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020171632

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 juli 2017  
Geplande einddatum: 1 juli 2022  
Titel project: Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe holmium microsfeer formuleringen voor intratumorale injectie  
Titel niet-technische samenvatting: Ontwikkeling van holmium bolletjes voor behandeling van tumoren  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.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

Overige bijlagen:

- DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:



Functie:



Plaats:

Utrecht

Datum:

26 april 2017

**Datum:**

2 mei 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1150020171632



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC  
Postbus 80.011  
3508 TA UTRECHT  


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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD1150020171632  
**Bijlagen**  
2

Datum 2 mei 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**  
Factuurdatum: 2 mei 2017  
Vervaldatum: 1 juni 2017  
Factuurnummer: 171632  
Ordernummer: o.v.v. CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1150020171632	€ 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.



**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** woensdag 31 mei 2017 15:25  
**Aan:** 'Info-zbo'  
**Onderwerp:** RE: vragen bij de behandeling van AVD1150020171632  
**Categorieën:** Dossier: [REDACTED]

Beste [REDACTED],

Hierbij onze reactie op de onderstaande vragen, Hoop dat het een beetje duidelijker wordt,

Met vriendelijke groet

[REDACTED]  
[REDACTED]

- Waarom is het nodig om dit onderzoek in 3 verschillende diersoorten uit te voeren?

**Voor fase 2:**

Als proefdier is hier gekozen voor de rat.

- Noodzakelijkheid tumor-model welke beschikbaar is in muizen, ratten en konijnen.

- Tumor relatief groot omdat we de verdeling van de microsferen willen beoordelen in de tumor. Deeltjes worden intra-tumoraal geïnjecteerd. Waarbij belangrijk is om de dracht van de straling in het achterhoofd te houden. De behandeling die we hier uiteindelijk mee willen doen – het gaat om radioactieve [REDACTED] met een maximale dracht van [REDACTED] in weefsel maar waar in de eerste [REDACTED] de meeste energie al wordt afgegeven. Dit betekent dat de tumor ca. [REDACTED] in diameter moet zijn waarover de deeltjes zich moeten verdelen. Bij een te kleine tumor zal de straling de volledige tumor maar ook daar buiten bestralen. We leren daardoor niets over de verdeling en injectietechniek. Hierdoor vallen muizen voor deze fase af.

- Voor de beeldvorming willen we gebruik maken van de [REDACTED]. Deze is geschikt voor muizen en ratten (niet al te grote ratten). Het is niet mogelijk om hierin een konijn te kunnen scannen, waardoor ook het konijn in deze fase afvalt. Dit maakt dat we uitgekomen zijn op het proefdier rat.

**Voor fase 3:**

- Noodzakelijkheid tumor-model welke beschikbaar is in muizen, ratten en konijnen.

- Tumor relatief groot omdat we de verdeling van de microsferen willen beoordelen in de tumor. Deeltjes worden intra-tumoraal geïnjecteerd. Waarbij belangrijk is om de dracht van de straling in het achterhoofd te houden. De behandeling die we hier uiteindelijk mee willen doen – het gaat om radioactieve [REDACTED] met een maximale dracht van [REDACTED] in weefsel maar waar in de eerste [REDACTED] de meeste energie al wordt afgegeven. Dit betekent dat de tumor [REDACTED] in diameter moet zijn waarover de deeltjes zich moeten verdelen. Bij een te kleine tumor zal de straling de volledige tumor maar ook daar buiten bestralen. We leren daardoor niets over de verdeling en injectietechniek. Hierdoor vallen muizen voor deze fase af.

- In deze fase ligt de nadruk op de effectiviteit van de behandeling. Het dier moet na de intra-tumorale injectie met (wel/niet radioactieve) microsferen een redelijke follow-up kunnen hebben om de effectiviteit te kunnen bepalen van de behandeling die is gegeven. De tumor moet na de behandeling nog door kunnen groeien. Dit is bij de muis of rat niet of slechts beperkt mogelijk door het beperkte formaat van de dieren. Deze vallen hierdoor af in deze fase. Bij de konijn is hier meer ruimte voor. Dit maakt dat we zijn uitgekomen op het proefdier konijn.

**Voor fase 4:**

Als proefdier is gekozen voor de muis. Dit proefdier wordt ook in de standaard biocompatibiliteitstesten gebruikt wereldwijd. Hierbij spelen tumoren geen rol en is het praktischer om deze experimenten – in de voorbereiding tot implementatie naar de patiënt toe – uit te voeren in muizen.

Is het mogelijk om de biocompatibiliteit en effectiviteitsstudies te combineren?

Zoals uit het bovenstaande naar voren komt is het niet mogelijk om de biocompatibiliteit en de effectiviteitsstudie te combineren. De effectiviteitsstudie wordt uitgevoerd in het konijn. Voor de biocompatibiliteitstudie wordt wereldwijd gebruik gemaakt van het proefdier muis. Om deze studie een voorbereiding te laten zijn op latere implementatie naar de patiënt is het praktischer om deze ook uit te voeren in muizen. Natuurlijk geven de konijnen in fase 3 – de effectiviteit studie – al wel beperkte informatie over de biocompatibiliteit.

---

**Van:** Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]  
**Verzonden:** dinsdag 23 mei 2017 14:00  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: vragen bij de behandeling van AVD1150020171632

Beste [REDACTED],

Zoals zojuist telefonisch besproken zou de CCD graag nog wat extra informatie over de volgende vragen ontvangen:

- Waarom is het nodig om dit onderzoek in 3 verschillende diersoorten uit te voeren?
- Is het mogelijk om de biocompatibiliteit en effectiviteitsstudies te combineren?

We hebben afgesproken dat de antwoorden in de volgende CCD vergadering van 2 juni worden besproken,

Vriendelijke groet, [REDACTED]

**Namens Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** woensdag 10 mei 2017 23:14  
**Aan:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl); [info@ivd-utrecht.nl](mailto:info@ivd-utrecht.nl); [REDACTED]  
**Onderwerp:** Re: vragen bij de behandeling van AVD1150020171632

Beste [REDACTED]

Bedankt voor uw opmerkingen naar aanleiding van onze CCD aanvraag AVD1150020171632  
Hierbij onze toelichtingen op uw vragen:

Vraag 1:

In de bijlage dierproeven onder C. zowel JA als NEE aangekruist bij hergebruik. U heeft als toevoeging geschreven dat u surplus dieren kunt overwegen voor hergebruik. Naïeve surplus dieren zijn waarschijnlijk niet eerder gebruikt in dierproeven, dit zou dan geen hergebruik zijn. Betreft het hergebruik/ inzetten van surplus dieren alleen de donordieren of ook de experimentele dieren? Kunt u dit duidelijker beschrijven in de bijlage dierproeven?

Er zijn in onze instelling in eerdere onderzoeken naïeve dieren beschikbaar gekomen, deze hebben we in eerdere experimenten dan ook gebruikt voor onze experimenten. Wij waren in de veronderstelling dat dit 'hergebruik' dieren waren. Echter dit blijken 'surplus dieren' te zijn. Deze zijn zeker bruikbaar voor zowel de donor dieren als voor de experiment dieren.

Hergebruik dieren waarbij eerder toedieningen van farmaca zijn gedaan zijn voor deze experimenten of donoren niet toepasbaar omdat we de tumorgroei niet hiermee willen beïnvloeden. Als er dieren vrij komen uit gedrachts-onderzoek (zonder toediening van farmaca) van goede soort/stam/leeftijd met goede conditie en dan kunnen deze dieren als donor of ook als experiment dier worden ingezet.

In de aanvraag - onder C - als volgt gewijzigd:

Als er surplus dieren van de goede soort/stam/leeftijd beschikbaar zijn kunnen de deze dieren in deze studie gebruikt worden. Hergebruik dieren van bv gedragsonderzoek - afhankelijk van voorgaande handelingen en conditie - waarbij er geen farmaca zijn toegediend kunnen als donor of als experiment dier worden ingezet.

Vraag 2:

Bij de ongerief classificatie geeft u aan dat de dieren cumulatief matig ongerief ondervinden. Dit lijkt vooral om de experimentele dieren te gaan omdat deze meerdere experimentele handelingen ondergaan. Uit de beschrijving maken wij op dat de donordieren veel minder experimentele handelingen ondergaan en mogelijk slechts licht ongerief ondervinden. Kunt u dit toelichten en wanneer van toepassing de donordieren apart opnemen in de beschrijving van de ongerief classificatie? Als dit wijzigt dan zal ook de Niet technische Samenvatting aangepast moeten worden.

U heeft inderdaad een goed punt dat de donor dieren veel minder handelingen ondergaan dan de experimentele dieren. Onder de oude wet zouden deze volgens onze inschatting onder "gering/matig ongerief" ingedeeld worden. Echter onder de nieuwe wet is de keuze "licht ongerief" of "matig ongerief".

In nieuw overleg met de instantie voor dierenwelzijn zijn we tot de inschatting "matig ongerief" gekomen, ondanks dat de dieren minder handelingen als de experimentele dieren ondergaan.

Het ongerief van de donoren hadden we niet apart vermeld bij de ongerief inschatting, excuus voor deze verwarring. We hebben dit in de bijgevoegde documenten aangepast.

Toegevoegd - onder K:

Bij de donoren wordt er een tumor geïmplanteerd (bij de rat na een roosje) waarna er tumor groei plaats vindt. Totale ongerief zal matig zijn.

Vraag 3:

Voor onze informatie; u beschrijft dat u proeven uitvoert ten behoeve van biocompatibility en toxiciteit, wordt niet vaak voorgeschreven om dit type studies in beide geslachten uit te voeren? Kunt u dit toelichten?

Als we de vraag goed interpreteren in relatie met ons project is de vraag waarom we niet voor beide geslachten kiezen i.p.v. alleen vrouwelijke dieren.

In deze fase van het onderzoek met langdurige follow-up worden experimenten met slechts een geslacht geaccepteerd (in dit geval vrouwelijke dieren). Al het voorgestelde onderzoek zal gebruik kunnen worden voor de registratie van deze microsferen in het zogenaamde "██████████" dat een belangrijk onderdeel zal vormen van een ██████████. Daarna zullen deze biocompatibility en toxiciteit experimenten een onderdeel vormen ██████████ ██████████ om de translatie naar - en toepassing bij - de patiënt mogelijk te maken. Dit traject heeft de holmium research groep al eerder doorgemaakt.

Rede waarom we in deze fase met alleen vrouwelijke dieren werken is de lange follow-up duur (tot een jaar) die in deze experimenten staan beschreven. Voor deze studie willen we de dieren onder optimale omstandigheden huisvesten, dit is in groepshuisvesting. Vanwege het risico op vachten is het niet mogelijk om mannelijke dieren zo lang in groepshuisvesting te houden. Met het oog op dieren welzijn hebben we gekozen om de dierenwelzijn in deze fase te laten overheersen en uit te voeren met vrouwelijke dieren.

We hopen de de reactie op uw vragen duidelijk zijn,

Met vriendelijke groet,

██████████  
██████████

---

**Van:** ██████████  
**Verzonden:** donderdag 4 mei 2017 15:02  
**Aan:** ██████████  
**Onderwerp:** Fwd: vragen bij de behandeling van AVD1150020171632

Verstuurd vanaf mijn iPhone

Begin doorgestuurd bericht:

**Van:** Info-zbo <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)>  
**Datum:** 4 mei 2017 14:54:08 CEST  
**Aan:** ██████████  
**Kopie:** 'Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht' <[info@ivd-utrecht.nl](mailto:info@ivd-utrecht.nl)>  
**Onderwerp:** vragen bij de behandeling van AVD1150020171632

Geachte ██████████

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend, bij de behandeling hiervan hebben wij een aantal vragen. Het betreft uw project: Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe ██████████ microsfeer formuleringen voor intratumorale injectie, met nummer AVD1150020171632. In de bijlage dierproeven onder C. zowel JA als NEE aangekruist bij hergebruik. U heeft als toevoeging geschreven dat u surplus dieren kunt overwegen voor hergebruik. Naïeve surplus dieren zijn waarschijnlijk niet eerder gebruikt in dierproeven, dit zou dan geen hergebruik zijn. Betreft het hergebruik/ inzetten van surplus dieren alleen de donordieren of ook de experimentele dieren? Kunt u dit duidelijker beschrijven in de bijlage dierproeven?

Bij de ongeriefclassificatie geeft u aan dat de dieren cumulatief matig ongerief ondervinden. Dit lijkt vooral om de experimentele dieren te gaan omdat deze meerdere experimentele handelingen ondergaan. Uit de beschrijving maken wij op dat de donordieren veel minder experimentele handelingen ondergaan en mogelijk slechts licht ongerief ondervinden. Kunt u dit toelichten en wanneer van toepassing de donordieren apart opnemen in de beschrijving van de ongeriefclassificatie? Als dit wijzigt dan zal ook de Niet technische Samenvatting aangepast moeten worden.

Voor onze informatie; u beschrijft dat u proeven uitvoert ten behoeve van biocompatibility en toxiciteit, wordt niet vaak voorgeschreven om dit type studies in beide geslachten uit te voeren? Kunt u dit toelichten?

Uw aanvraag zal op 12 mei door de CCD besproken worden,

Met vriendelijke groet, ██████████

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028

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

---

*De informatie opgenomen in dit bericht kan vertrouwelijk zijn en is uitsluitend bestemd voor de geadresseerde. Indien u dit bericht onterecht ontvangt, wordt u verzocht de inhoud niet te gebruiken en de afzender direct te informeren door het bericht te retourneren. Het Universitair Medisch Centrum Utrecht is een publiekrechtelijke rechtspersoon in de zin van de W.H.W. (Wet Hoger Onderwijs en Wetenschappelijk Onderzoek) en staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel voor Midden-Nederland onder nr. 30244197.*

*Denk s.v.p aan het milieu voor u deze e-mail afdrukt.*

---

*This message may contain confidential information and is intended exclusively for the addressee. If you receive this message unintentionally, please do not use the contents but notify the sender immediately by return e-mail. University Medical Center Utrecht is a legal person by public law and is registered at the Chamber of Commerce for Midden-Nederland under no. 30244197.*

*Please consider the environment before printing this e-mail.*



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 11500
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. UMC Utrecht
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef  |
|------------|---|
| 01         | Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe [REDACTED] microsfeer formuleringen voor intratumorale toediening. |
- Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Alvorens de nieuw ontwikkelde [REDACTED] microsferen getransleerd kunnen worden naar de mens zijn enkele dierproeven noodzakelijk. De verschillende microsferen – als formulering in een toedieningsvloeistof - zullen eerst gekarakteriseerd worden volgens de volgende strategie:

**Fase 1:** in-vitro ontwikkeling en testen van nieuwe [REDACTED] microsferen (al een lopend proces)

De vier meest optimale microsferen met de daarbij behorende twee meest optimale toedieningsvloeistoffen per microsfeer worden verder mee genomen naar de in-vivo studie. Totaal [REDACTED].

**Fase 2:** microsfeer distributie over de tumor (**rat**)

- Na tumor implantatie (s.c.) en groei hiervan wordt er intra tumoraal [REDACTED] microsferen toegediend. Na de injectie wordt er een [REDACTED] gemaakt om de verdeling en eventuele 'doorschieten' te detecteren. Op een tijdsreeks wordt het dier opgeofferd en worden de tumoren en organen geïsoleerd om ex-vivo verder te analyseren of eerder als het HEP wordt bereikt.

Groepsindeling voor iedere microsfeer:

Maximaal 4 soorten microsferen; onafhankelijk van elkaar uitgevoerd; en twee test toedieningsvloeistoffen per microsfeer; (i.e. ms-A, ms-B, ms-C en ms-D; td-A; td-B) (*ms = microsferen; td = toedieningsvloeistof; [REDACTED]*)

Hierbij zijn per ontwikkelde ms (n=4)

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- Totaal maximaal [REDACTED] groepen per ontwikkelde microsfeer  
( [REDACTED] )

**Fase 3:** effectiviteit van de microsfeer behandeling op de tumorgroei (**konijn**)

- Na tumor implantatie en tumor groei wordt er intra-tumoraal een oplopende dosis radioactiviteit toegediend om het effect op de tumor te bepalen. Na de toediening vindt er beeldvorming plaats om de [REDACTED] distributie te bekijken en te controleren of er geen eventuele lekkage van de activiteit heeft plaats gevonden. Dit kan direct of enkele dagen erna. Gedurende de follow-up wordt de tumorgroei gevolgd en worden er nog meer scans gemaakt om het verloop van de verdeling in beeld te krijgen (Beeldvorming [REDACTED] zichtbaar is). Als de tumor [REDACTED] het begin volume heeft bereikt of het HEP bereikt is wordt het dier getermineerd. Isolatie van tumor en organen voor ex-vivo analyse.

Maximaal 4 soorten microsferen; onafhankelijk van elkaar uitgevoerd; en twee test toedieningsvloeistoffen per microsfeer; (i.e. ms-A, ms-B, ms-C en ms-D; td-A; td-B) (*ms = microsferen; td = toedieningsvloeistof; [REDACTED]*)

Hierbij zijn per ontwikkelde ms (n=4)

- z [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- Totaal maximaal [REDACTED] groepen per ontwikkelde microsfeer  
[REDACTED]

**Fase 4:** Testen biocompatibiliteit in-vivo (**muis**)

Bepalen release van [REDACTED] in een tijdreeks na i.p. toedienen van microsfeer formuleringen, zowel [REDACTED] microsferen als ([REDACTED]) [REDACTED] microsferen. Daarnaast wordt het supernatant van de formuleringen mee genomen. Als formulering wordt gezien de microsfeer (ms) + toedieningsvloeistof (td). Als controle wordt [REDACTED] mee genomen.

Groepsindeling: Voor microsfeer A (maximaal 4 soorten microsferen; onafhankelijk van elkaar uitgevoerd; en twee toedieningsvloeistoffen per microsfeer; allen onafhankelijk van elkaar getest; (i.e. ms-A, ms-B, ms-C en ms-D; td-A; td-B) (*ms = microsferen; td = toedieningsvloeistof; ms-form. = microsfeer formulering; [REDACTED]*))

Hierbij zijn per ontwikkelde ms (n=4)

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- Totaal maximaal [REDACTED] groepen per ontwikkelde microsfeer  
[REDACTED]

Tot maximaal [REDACTED] maal per week wordt er bloed afgenomen (houdend aan de maximale toegestane hoeveelheid (8 ml/kg / 2 wk. )). Ook [REDACTED] [REDACTED] worden gecontroleerd op [REDACTED] content als algemene parameter [REDACTED] in vivo. Op vaste tijdstippen worden de dieren getermineerd – of eerder als het HEP wordt bereikt – en worden de relevante organen geïsoleerd en de biodistributie van [REDACTED] wordt hierin bepaald.



### **Donor dieren (rat en konijn)**

Voor het in vivo in kweek houden van de tumormodellen (zoals VX2 in het Konijn, zoals de R1 in de rat) voor onderdelen uit dit project zijn we genoodzaakt gebruik te maken van donordieren. Dat er voor deze tumorcellen donordieren nodig zijn is omdat de tumoren niet direct uit cellen te gebruiken zijn. De opbouw van de tumor is dan nog niet stabiel en varieert qua groei, vorm en necrotische haard. Pas na opkweek in een (tot twee) passages in het dier krijg je een stabiele goed gevasculariseerde tumor die transplanteerbaar is. Binnen het [REDACTED] zijn er mogelijk andere onderzoekers die hier voor hun onderzoek gebruik van kunnen maken. Dit heeft in het verleden tot vermindering van donor dieren heeft geleid.

De VX2 tumor voor in het konijn is een tumor die al beschreven is in 1935 en wordt gebruikt als tumormodel in de lever, hoofd/hals, pancreas baarmoeder, longen etc.. De tumor groeit stabiel, is goed gevasculariseerd en is een alom gebruikt tumor model in het konijn, ook in de beeldvormende onderzoekslijnen. Met deze tumorlijn is veel ervaring binnen de groep.

Voor de ratten zijn er meerdere tumormodellen mogelijk zoals bijvoorbeeld de Nude-rat of WagRij rat met de R1-tumor (rabdomyosarcoom). Deze is al heel lang in gebruik, groeit erg stabiel groeit en is goed doorbloed.

---

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

---

### **Fase 2: microsfeer distributie over de tumor (rat; tumor)**

- Onder anesthesie implantatie van tumorweefsel (zoals bv. De R1 tumor) in de flank<sup>#</sup>. Na tumor groei onder injectie anesthesie intra-tumorale injectie met [REDACTED] microsferen of [REDACTED] vloeistof gevolgd door een scan (extern). Gedurende de follow up - op indicatie – een extra scan (extern) onder injectie anesthesie. Op een reeks van tijdstippen anesthesie, bloedafname en terminatie<sup>##</sup>. Isolatie van organen en tumoren voor [REDACTED] content en verdeling en histologie. (maximaal [REDACTED] tijdstippen; maximaal tot 21 dagen)

<sup>#</sup> : indien de tumor de eerste implantatie onverhoopt niet aanslaat kan deze procedure een tweede maal geprobeerd worden om zo het aantal dieren niet te hoeven vergroten. Ervaring bij de R1 tumor is dat 95% van de her-implantaties aanslaan.

<sup>##</sup>: of eerder als het dier het Humane Eind Punt (HEP) dreigt te halen

### **Fase 3: Effectiviteit [REDACTED] microsfeer behandeling en microsfeer distributie over de tumor. (konijn; tumor)**

- Na preventieve pijnstilling implantatie van tumorweefsel s.c. of i.m. op de achterpoot (of eventueel flank)<sup>#</sup>. Na voldoende tumorgroei transport naar extern, toedienen anesthesie en intra-tumorale injectie met olopende dosis radioactieve microsferen gevolgd door scan (CT, MRI of echo).

Gedurende de follow-up worden er bloedafnames gedaan (maximaal [REDACTED] en extra scans onder anesthesie (extern; maximaal [REDACTED] Terminatie als de tumor 4\* het begin volume (V0) is of eerder als HEP is bereikt (maximaal 45 dagen na behandeling). Isolatie van de tumor en organen voor ex-vivo analyse. (biodistributie [REDACTED] in de organen, histologie)

# : Voorkeur voor implantatie s.c. echter in voorkomende gevallen slaat de tumor beter aan in de spier (meer bloedvoorziening).

# : indien de tumor de eerste implantatie onverhoopt niet aanslaat kan deze procedure een tweede maal geprobeerd worden om zo het aantal dieren niet te hoeven vergroten. Ervaring bij de VX2 tumor is dat >65% van de her-implantaties aanslaan.

#### **Fase 4:** Testen biocompatibiliteit in-vivo

Bepalen [REDACTED] release in het dier gedurende de tijd (**muis**)

- Onder een roesje worden de microsferen i.p. toegediend.
- Regelmatige controle op welzijn en gedrag gedurende de follow-up. Afwijkend gedrag t.o.v. de blanco geïnjecteerde dieren wordt gescoord.
- Gedurende de follow-up vindt er bloedafname plaats (maximaal [REDACTED] max 8 ml /kg/2wk) en [REDACTED] plaats (bij voorkeur [REDACTED] Terminatie op vaste tijdstippen (maximaal 6\*; tot maximaal 1 jaar na behandeling) waarna de organen voor ex-vivo analyse worden geïsoleerd. (biodistributie [REDACTED] in organen, histologie)

#### **Donor dieren:**

Donor dieren rat:

- Onder anesthesie implantatie van tumorweefsel (zoals bv. De R1 tumor) in de flank<sup>#</sup>. Na voldoende tumorgroei om als donor te dienen terminatie waarna tumormateriaal wordt geïsoleerd voor implantatie bij nieuwe dieren (nieuwe donor en experimentele dieren).

# : indien de tumor de eerste implantatie onverhoopt niet aanslaat kan deze procedure een tweede maal geprobeerd worden om zo het aantal dieren niet te hoeven vergroten. Ervaring binnen onze groep is dat 95% van de her-implanteerde dieren alsnog een tumor ontwikkelen na een tweede implantatie.

Donor dieren konijn:

- Na preventieve pijnstilling implantatie van tumorweefsel s.c. of i.m. op de achterpoot (of eventueel flank)<sup>#,##</sup>. Na Voldoende tumorgroei om als donor te dienen terminatie waarna tumormateriaal wordt geïsoleerd voor implantatie bij nieuwe dieren (nieuwe donor en experimentele dieren).

# : indien de tumor de eerste implantatie onverhoopt niet aanslaat kan deze procedure een tweede maal geprobeerd worden om zo het aantal dieren niet te hoeven vergroten. Ervaring bij de VX2 tumor is dat > 65% van de her-implantaties aanslaan.

##: Voorkeur voor implantatie s.c. echter in voorkomende gevallen slaat de tumor beter aan in de spier (betere bloedvoorziening).

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

Voordat de microsferen in de [REDACTED] worden getest, wordt eerst de stabiliteit uitvoerig in-vitro en ex-vivo getest. Geselecteerde formuleringen worden pas nadat gebleken is dat de compositie, grootte en stabiliteit en de [REDACTED] lekkage conform de eisen zijn op hun bio-compatibiliteit in vivo getest.

Gebruikte afkortingen:

[REDACTED]; onafhankelijk van elkaar uitgevoerd; en [REDACTED] per microsfeer; allen onafhankelijk van elkaar getest; (i.e. ms-A, ms-B, ms-C en ms-D; td-A; td-B) (ms = microsferen; td = toedieningsvloeistof; ms-form. = microsfeer formulering; [REDACTED]; [REDACTED])

### Fase 2:

De groepsgrootte voor deze fase wordt bepaald volgens Chi<sup>2</sup> variance; distance from constant; one tailed.

Hierbij wordt als uitleesparameter de verdeling van de activiteit over de tumor gebruikt. Doel is [REDACTED] van de tumor met Holmiumdeeltjes verdeeld, controle vloeistof wordt [REDACTED] verdeeld (FZ). Effect is dan [REDACTED] Met een alfa van 5%, power van 80% wordt hier een groepsgrootte van [REDACTED] **dieren per groep** verkregen.

De groepen zijn als volgt gepland:

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- Totaal maximaal [REDACTED] **groepen** per ontwikkelde microsfeer

[REDACTED]

Totaal komen we dan uit voor iedere ontwikkelde [REDACTED] microsfeer op [REDACTED] = 175 dieren per ontwikkelde microsfeer. Voor alle vier de ontwikkelde microsferen zijn dit maximaal ( 4 \* 175 ) = **700 ratten**.

### Fase 3:

De groepsgrootte voor deze fase wordt bepaald volgens de t-test; difference between slopes; two tailed.

Hierbij wordt als parameter het verschil in tumorgroei tijd tot [redacted] gebruikt. Met een spreiding van ca. [redacted] een alfa van 5% en een power van 80% te verkrijgen komen we uit op **[redacted] dieren per groep.**

De groepen zijn als volgt gepland:

Hierbij zijn per ontwikkelde ms (n=4)

- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- Totaal maximaal **[redacted] groepen** per ontwikkelde microsfeer  
[redacted]

Totaal komen we dan uit voor iedere ontwikkelde [redacted] microsfeer op [redacted] = 49 dieren per ontwikkelde microsfeer. Voor alle vier de ontwikkelde microsferen zijn dit maximaal ( 4 \* 49 ) = **196 konijnen.**

#### Fase 4:

De groeps grootte voor deze fase wordt bepaald volgens de t-test; difference between slopes; two tailed.

Hierbij wordt als parameter het verschil in de negatieve effecten op de omliggende organen bepaald (Ho content; histologie). We hopen hier geen effect te vinden tussen de controles en de behandelde dieren. Een effect van [redacted] een alfa van 5% en een power van 90% te verkrijgen komen we uit op **[redacted] dieren per groep.** De gekozen power is hoger dan in fase 2 en 3 daar in deze fase de eerste onderzoeken voor veiligheid op langere termijn worden onderzocht.

De groepen zijn als volgt gepland:

- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- Totaal maximaal **[redacted] groepen** per ontwikkelde microsfeer  
[redacted]

Totaal komen we dan uit voor iedere ontwikkelde [redacted] microsfeer op [redacted] = 300 dieren per ontwikkelde microsfeer. Voor alle vier de ontwikkelde microsferen zijn dit maximaal ( 4 \* 300 ) = **1200 muizen.**

**Donoren:**

Dit zijn dieren die dienen als tumordonor voor de experimentele dieren die in de komende jaren worden ingezet. Als er een periode is waarbij geen tumor gebruikt wordt worden er ook geen donor dieren ingezet. Binnen het [REDACTED] zijn er andere onderzoekers die hier mogelijk voor hun onderzoek gebruik van kunnen maken. Dit heeft in het verleden tot vermindering van donor dieren heeft geleid.

Voor zowel de rat als voor het konijn geldt:

- Per implantatie worden twee dieren ingezet als donor
- Tumor groei duurt 3-4 weken voor deze geogst kan worden.
- Per jaar betekend dit 13 tot 17 maal overzetten (gem. 15)
- Totaal over 5 jaar: 5 jaar \* 15 maal \* 2 dieren = 150 dieren.

Totaal **maximaal 150 ratten over 5 jaar**

Totaal **maximaal 150 konijnen over 5 jaar**

---

**B. De dieren**

---

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

---

**Fase 2:**

Voor de ratten zijn er meerdere tumormodellen mogelijk zoals bijvoorbeeld de Nude-rat of WagRij rat met de R1-tumor (rhabdomyosaroom). Deze is al heel lang in gebruik, is erg stabiel groeit en goed doorbloed is.

Als proefdier is gekozen voor de rat omdat hiervan meerdere tumormodellen beschikbaar zijn, zoals bv. De R1 tumor in de Nude-rat of WagRij rat. Deze tumoren zijn groot genoeg voor een technisch uitvoerbare lokale injectie van een suspensie van [REDACTED] microsferen.

De dieren worden betrokken van een officiële leverancier in de EU, leeftijd van 6-8 weken. Op deze leeftijd is er voldoende "body" om de behandeling te kunnen verdagen; In verband met de [REDACTED] die wordt uitgevoerd na de behandeling met de [REDACTED] microsferen is de voorkeur voor vrouwelijke dieren. De mannelijke nude-ratten zijn al gauw te groot om met de  $\mu$ CT te kunnen worden gescand. Vrouwelijke dieren van ca. 11-12 weken wegen ca. 200 gram; mannelijke dieren zijn dan al 350 gram. Maximaal 4 \* 175 dieren

**Fase 3:**

Als proefdier is gekozen voor het konijn omdat hiervan een bekend tumor model beschikbaar is. Daarbij zijn de tumoren groot genoeg om de effectiviteit van de radioactieve microsferen te onderzoeken. In deze fase ligt de nadruk op effectiviteit. Waarbij de dracht van het [REDACTED] maximaal 9 mm is. Dit aspect kan alleen in goed in een grotere tumoren van ca. 1.5 cm in doorsnede worden getest.

Hierbij wordt gebruik gemaakt van New Zealand White konijnen van een officiële leverancier in de EU; 8-10 weken; ca. 2.5-3.5 kg (*kunnen tumoren, zoals het VX2 tumor model, goed aan en ondervinden hier niet veel ongerief van*); Bij voorkeur vrouwelijke dieren. Dit i.v.m. groepshuisvesting, wat bij mannelijke dieren niet mogelijk is. Daarnaast is er bij mannelijke dieren risico op sproeien, wat met de radioactiviteit niet gewenst is i.v.m. veiligheid van medewerkers. Maximaal 4 \* 49 dieren

#### **Fase 4:**

Als proefdier is gekozen voor de muis. Dit proefdier wordt ook in de standaard biocompatibiliteitstesten gebruikt wereldwijd. De hoeveelheden microsfeer suspensie en/of supernatant is aangepast aan de grootte van het proefdier. Hierbij wordt gebruik gemaakt van muizen, zoals de Balb/C van 4-6 weken. Betrokken van een officiële leverancier binnen de EU; Hierbij is de voorkeur voor vrouwelijke dieren, gezien de lange follow-up. Mannelijke dieren zijn niet in groepshuisvesting te huisvesten.

Maximaal 4 \* 300 dieren.

#### **Donoren:**

Rat:

Hierbij wordt gebruik gemaakt van ratten, zoals de Nude rat of de WagRij, van 6-8 weken (voldoende "body" om de behandeling te kunnen verdragen. De dieren worden betrokken van een officiële leverancier in de EU; Net als bij de experimenten wordt gekozen voor vrouwelijke dieren in verband met vergelijkbare tumorgroei. Maximaal 150 dieren.

Konijn:

Hierbij wordt gebruik gemaakt van New Zealand White konijnen van een erkende leverancier binnen de EU; 8-10 weken; ca 2.5-3.5 kg (*kunnen tumoren, zoals het VX2 tumor model, goed aan en ondervinden hier niet veel ongerief van*); Net als bij de experimenten wordt gekozen voor vrouwelijke dieren in verband met vergelijkbare tumorgroei. Maximaal 150 dieren

---

### **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

Als er surplus dieren van de goede soort/stam/leeftijd beschikbaar zijn kunnen de deze dieren in deze studie gebruikt worden. Hergebruik dieren van bv gedragsonderzoek - afhankelijk van voorgaande handelingen en conditie - waarbij er geen farmaca zijn toegediend kunnen als donor of als experiment dier worden ingezet.

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

Nee

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

Ernstig ongerief is niet te verwachten, daar er al verschillende ████████-microsferen al in het dier (veterinair) of in de mens wordt toegepast. Ook hierin is

■■■■■ en ■■■■■ aanwezig. Voor translatie naar de mens is het wel nodig om dit in vivo te onderzoeken

#### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

##### Vervanging:

Er wordt als eerste vele testen in-vitro / ex-vivo uitgevoerd om de veiligheid voor het dier zo hoog mogelijk te houden. Om de translatie naar de mens mogelijk te maken is het nodig om de microsferen in een heel organisme te testen. Hierdoor is het gebruik van dieren niet te voorkomen.

##### Vermindering:

Door statistische berekeningen worden er voldoende dieren per groep genomen om voldoende zekerheid te hebben van wat er uit de experimenten komt, zodat dit voldoende zou zijn om goede conclusies te kunnen trekken uit de resultaten.

##### Verfijning:

De dieren worden regelmatig gecontroleerd en waar nodig wordt pijnstilling toegepast of wordt het dier geëuthanaseerd als het humane eindpunt dreigt te worden bereikt. (wat niet te verwachten is).

Al het voorgestelde onderzoek zal gebruikt kunnen worden voor de registratie van deze microsferen in het zogenaamde "■■■■■" dat een belangrijk onderdeel zal vormen ■■■■■. Daarnaast zullen de biocompatibiliteit en effectiviteit een essentieel stuk vormen in de ■■■■■ om de translatie naar - en toepassing bij - de patiënt mogelijk te maken.

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

Gevoelige/pijnlijke handelingen worden uitgevoerd onder een lichte verdoving of anesthesie; in overleg met de IvD. Daarnaast worden de dieren goed gecontroleerd en getraind op handelen. Dit zorgt ervoor de dieren het uitvoeren van de controles niet als stress-voel ervaren.

### **Herhaling en duplicering**

#### **E. Herhaling**

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

n.v.t.

### **Huisvesting en verzorging**

## F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

## G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

A: Er zou irritatie ten gevolge van de nieuw ontwikkelde ████████ micorsferen kunnen ontstaan. Hiervoor worden de dieren ook regelmatig gecontroleerd op algemene welzijnskenmerken (Gedrag, houding, verzorging, uiterlijk en sociale activiteiten) om dit voor te zijn.

B: Een paar groepen zullen de leeftijd van 1 jaar overschrijden en zouden daar ongerief van kunnen ondervinden. Voor de muizen (fase 4) is dit 17% van de dieren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.



A: Lekkage van bestanddelen van de microsfeer of irritatie toedieningsvloeistof.

B: ouderdom

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

Uitgebreide in-vitro testen vooraf; regelmatige diercontroles gedurende het experiment

### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Fase 2: rat - HEP: tumorvolume  $\geq 10\%$  van het lichaamsgewicht; ulceratie van de tumor; gewichtsverlies (20% t.o.v. begin; 15% binnen 2-3 dagen); verminderde (>1 dag) of afwezige activiteit; klinische verschijnselen die duiden op ongewenst ongerief.

Fase 3: konijn - HEP: tumorvolume  $\geq 10\%$  van het lichaamsgewicht; ulceratie van de tumor; klinische verschijnselen die duiden op ongewenst ongerief.

Fase 4: muis - HEP: gewichtsverlies (20% t.o.v. begin; 15% binnen 2-3 dagen); verminderde (>1 dag) of afwezige activiteit; klinische verschijnselen die duiden op ongewenst ongerief.

We verwachten van de microsferen en toedieningsvloeistof zelf geen omstandigheden die humane eindpunt zouden opleveren. Zodra dit wel het geval zou zijn zal - eventueel in overleg met de dierenarts - het dier worden getermineerd.

De dieren die gedurende 12 maanden gevolgd worden worden ouder dan 1 jaar. Het is bekend dat spontane tumoren door veroudering kunnen ontstaan. Zodra dit welzijnsaantasting betekent is dit direct een reden voor euthanasie.

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

<1% mbt het beschreven protocol;

27% van de dieren binnen fase 4 worden ouder dan 1 jaar en zouden daar nadeel aan kunnen ondervinden.

### **K. Classificatie van ongerief**

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

Fase 2:

Onder narcose/roesje tumor implantatie; tumorgroei; ████████ microsfeer injectie onder narcose + scan; follow-up met regelmatige controle; doden en

isolatie bloed en organen voor ex-vivo analyse. Het totale ongerief zal matig zijn.

Fase 3:

Na pijnstilling tumor implantatie; tumorgroei; ████████ microsfeer injectie onder narcose; scan onder narcose; follow up met scans onder narcose; regelmatige welzijnscontrole; doden en isolatie van organen voor ex-vivo analyse. Het totale ongerief zal matig zijn.

Fase 4:

injectie microsferen onder roesje; regelmatige welzijnscontrole; bloed/urine verzamelen; doden op vaste tijdstippen; isolatie organen voor ex-vivo analyse. Het totale ongerief zal matig zijn.

Donoren:

Bij de donoren wordt er een tumor geïmplant (bij de rat na een roesje) waarna er tumor groei plaats vindt. Totale ongerief zal matig zijn.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Isolatie van relevante organen voor Ex-vivo analyse (██████ content en histologie).

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD1150020171632

**Bijlagen**

1

Datum 6 juni 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 2 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe holmium microsfeer formuleringen voor intratumorale injectie" met aanvraagnummer AVD1150020171632. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 10 mei en 31 mei 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u gevraagd eventueel hergebruik en het ongerief van de dieren meer te beschrijven, u heeft bijlage 3.4.4.1 aangepast. Uw aanvraag is in de vergadering van 12 mei 2017 door de CCD besproken. De aanvraag is in deze vergadering aangehouden omdat er nog een aantal onduidelijkheden waren voor de CCD. Op 23 mei hebben wij u om aanvullende informatie gevraagd. U heeft deze vragen beantwoord, de documenten zijn op basis van uw antwoorden niet nogmaals aangepast. Uw aanvraag is in de vergadering van 2 juni 2017 opnieuw door de CCD besproken.

### **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 "Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe holmium microsfeer formuleringen voor intratumorale injectie" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 juli 2017 tot en met 30 juni 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de looptijd van een vergunning niet langer kan zijn dan 5 jaar.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

**Datum:**  
6 juni 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020171632

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 26 april 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

- Vergunning
- Hiervan deel uitmakend:
  - DEC-advies
  - Weergave wet- en regelgeving

**Datum:**  
6 juni 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020171632



# Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: UMC Utrecht  
Adres: Postbus 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juli 2017 tot en met 30 juni 2022, voor het project "Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe holmium microsfeer formuleringen voor intratumorale injectie" met aanvraagnummer AVD1150020171632, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Senior Onderzoeker. Voor de uitvoering van het project is Research biotechnicus verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 2 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 2 mei 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 2 mei 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 26 april 2017, ontvangen op 2 mei 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 10 mei en 31 mei 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1 Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe holmium microsfeer formuleringen voor intratumorale toediening.</b>				
	Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) /	1.200	100% Matig	
	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) /	850	100% Matig	
	Konijnen ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ) /	346	100% Matig	

## Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020171632

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



**Aanvraagnummer:**

AVD1150020171632

## Weergave wet- en regelgeving

### **Dit project en wijzigingen**

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn



**Aanvraagnummer:**

AVD1150020171632

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.