

Inventaris Wob-verzoek W21-04		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	Aanvraagdossier 20173345	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	E-mail van VGH inzake aanvraag van projectnummer, d.d. 7 september 2017 (1/2)				x		x	x	
2	E-mail van CCD aan VGH inzake aanvraag van projectnummer, d.d. 7 september 2017 (2/2)				x		x		
3	Aanvraagformulier, d.d., 2-11-2017				x		x	x	
4	Project Proposal, d.d. 2-11-2017			x					
5	Project Proposal (ander document), d.d. 2-11-2017			x					
6	Description Animal Procedures #1, d.d. 2-11-2017			x					
7	Description Animal Procedures #1 (ander document), d.d. 2-11-2017			x					
8	Description Animal Procedures #1 (ander document), d.d. 2-11-2017			x					
9	Description Animal Procedures #1 (ander document), d.d. 2-11-2017			x					
10	Description Animal Procedures #2, d.d. 2-11-2017			x					
11	Description Animal Procedures #3, d.d. 2-11-2017			x					
12	Inkooporder, d.d. 2-11-2017				x		x	x	
13	Begeleidende e-mail CCD inzake factuur, d.d. 3-11-2017				x			x	
14	Factuur, d.d. 3-11-2017				x		x	x	
15	DEC-adviesaanvraag, d.d. 3-11-2017				x			x	
16	Bevestiging CCD aan VGH inzake DEC-adviesaanvraag, d.d. 3-11-2017				x		x	x	
17	Begeleidende e-mail ontvangstbevestiging aanvraag, d.d. 3-11-2017				x		x	x	
18	Ontvangstbevestiging aanvraag, d.d. 3-11-2017				x		x	x	

19	Algemene e-mail correspondentie tussen CCD en VGH, d.d. 4-12-2017 (1/2)					x		x	
20	Algemene e-mail correspondentie tussen CCD en VGH, d.d. 5-12-2017 (2/2)					x		x	
21	DEC-advies, d.d. 15-12-2017					x		x	x
22	Verzoek van CCD aan VGH inzake aanvullende informatie, d.d. 17-1-2018 (1/6)					x		x	
23	Verzoek van CCD aan VGH inzake aanvullende informatie, d.d. 17-1-2018 (2/6)					x		x	
24	Verzoek van CCD aan VGH inzake aanvullende informatie, d.d. 22-1-2018 2018 (3/6)					x		x	
25	Verzoek van CCD aan VGH inzake aanvullende informatie, d.d. 5-2-2018 2018 (4/6)					x		x	
26	Verzoek van CCD aan VGH inzake aanvullende informatie, d.d. 16-2-2018 2018 (5/6)					x		x	
27	Verzoek van CCD aan VGH inzake aanvullende informatie, d.d. 16-2-2018 2018 (6/6)					x		x	
28	Begeleidende e-mail CCD inzake beslissing, d.d. 21-2-2018					x		x	x
29	Besluit, d.d. 21-2-2018					x		x	x
30	CCD terugkoppeling aan DEC, d.d. 26 februari 2018					x		x	x
31	NTS versie 1			x					
32	NTS versie 2	x							
33	Interne e-mail CCD inzake factuur, d.d. 3-11-2017					x		x	x
34	Interne e-mail CCD inzake aanvraag, d.d. 3-11-2017					x		x	
35	Interne Advies Nota, d.d. 5-1-2018								x
36	Interne e-mail CCD inzake ondertekening beschikking, d.d. 21-2-2018					x		x	
37	Interne e-mail CCD inzake publicatie NTS, d.d. 26-2-2018					x		x	

Van: IvD WR
Aan: "Info-zbo (info@zbo-ccd.nl)"
Onderwerp: aanvraag projectnummer
Datum: donderdag 7 september 2017 09:59:34

1

L.S.,

Graag ontvang ik een projectnummer (AVD401002017....) voor een project met de titel "Vaccin controles"

Met vriendelijke groeten,

10.2.e

secretaris DEC-WUR en IvD-WR

10.2.g

10.2.g

10.2.e

10.2.g

aanwezig: ma+di:8-16:30, wo+do: 8-12

Dit bericht is uitsluitend bestemd voor geadresseerde. Het bericht kan vertrouwelijke informatie bevatten. Gebruik door derden of openbaarmaking van dit bericht zonder toestemming van 10.2.g is niet toegestaan. Als u dit bericht per abuis heeft ontvangen, wordt u verzocht het te vernietigen en ons te informeren.

Van: Info-zbo
Aan: "IvD WR"
Onderwerp: RE: aanvraag projectnummer
Datum: donderdag 7 september 2017 10:48:52

Geachte mevrouw 10.2.e

Op uw verzoek reserveren wij, vooruitlopend op uw aanvraag, het onderstaande projectaanvraagnummer:

AVD4010020173345 "Vaccin controles"

Gelieve dit nummer te gebruiken in alle met ons over dit project gevoerde correspondentie.

Let wel: het toekennen van dit projectaanvraagnummer betekent geenszins dat de beoordelingstermijn al gestart is.

Deze termijn start pas bij het indienen van de projectaanvraag.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl

.....
 Bezuidenhoutseweg 73 | 2594 AC | Den Haag
 Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Van: IvD WR 10.2.g

Verzonden: donderdag 7 september 2017 9:59

Aan: 'Info-zbo (info@zbo-ccd.nl)'

Onderwerp: aanvraag projectnummer

L.S.,

Graag ontvang ik een projectnummer (AVD401002017....) voor een project met de titel "Vaccin controles"

Met vriendelijke groeten,

10.2.e

secretaris DEC-WUR en IvD-WR

10.2.g

10.2.g

10.2.e

10.2.g

aanwezig: ma+di:8-16:30, wo+do: 8-12

.....
 Dit bericht is uitsluitend bestemd voor geadresseerde. Het bericht kan vertrouwelijke informatie bevatten. Gebruik door derden of openbaarmaking van dit bericht zonder toestemming van 10.2.g is niet toegestaan. Als u dit bericht per abuis heeft ontvangen, wordt u verzocht het te vernietigen en ons te informeren.

AVD4010020173345

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 of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	40100
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	Stichting Wageningen Research dr. 10.2.e 09098104
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 Postbus Postcode en plaats Iban Tenaamstelling van het rekeningnummer	10.2.g Wageningen University & Research
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker	(Titel) naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer Email adres	10.2.e [x] Dhr. [] Mw.

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

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en Startdatum	1-1-2018	
	einddatum van het project?	31-12-2023	
3.2	Wat is de titel van het project?	Vaccin Controles	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Vaccin Controles	
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	10.2.g

4 Betaalgegevens

4.1	Om welk type aanvraag gaat het?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning €1.541
4.2	Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD	<input type="checkbox"/> Wijziging €
		<input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso
		<input checked="" type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur

Centrale Commissie
Dierproeven Postbus 20401
2500 EK Den Haag

- dat de dieren worden gehulsvest 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	dr. 10.2.e	10.2.e
Functie	gemandateerd	
Plaats	Wageningen	
Datum	2-11-2017	
Handtekening		

**Form
Project proposal**

- This form should be used to write the project proposal of animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed
- For more information on the project proposal, see our website(www.zbo-ccd.nl).
- 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. | Vaccin Controles |

2 Categories

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

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Om de veiligheid en werkzaamheid/potentie van vaccinproducten voor mens en dier te garanderen, stellen overheden wereldwijd het verplicht dat deze producten gecontroleerd dienen te worden. In Europese Gemeenschap moet verplicht voldaan worden aan de voorschriften van de Europese Pharmacopoeia, besloten in EU Council Directive 81/852/EEC. In Nederland is dit vastgelegd in de Wet Dieren. Op de naleving van de bepalingen in de Wet Dieren ten aanzien van diergeneesmiddelen en de daaruit voortvloeiende eis van conformiteit aan de Europese Pharmacopoeia wordt toegezien door het Bureau Diergeneesmiddelen van het College ter Beoordeling van Geneesmiddelen. Veel van deze controles kunnen worden uitgevoerd *in vitro*, in het laboratorium, maar voor de controle van de werkzaamheid van vaccinproducten is het in het algemeen nodig om dit *in vivo*, in een dier uit te voeren. De voornaamste reden hiervoor is dat een vaccine werkt via het immuunsysteem van de gevaccineerde, omdat de werking van dit immuunsysteem zeer complex is en het niet mogelijk is na te bootsen of te simuleren.

Voor een aantal diervaccins voert het instituut deze controles uit voor vrijgifte in alle lidstaten van de EU waar deze vaccins zijn toegelaten. Zo wordt voorkomen dat de controles moeten worden uitgevoerd in elke afzonderlijke lidstaat.

De werkzaamheid/potentie van de volgende componenten van aantal gebruiksklare geformuleerde vaccinproducten worden gecontroleerd met een component specifieke potentie controle test:

- 1.) Mink Enteritis Virus gedood virus component;
- 2.) *Clostridium botulinum* Type C component;
- 3.) *Pseudomonas auruginosa* bacterin toxoid component.

De formulaties van gecontroleerde vaccinproducten bestaan uit een of meerdere van de bovenstaande componenten, met hierbij een aantal hulpstoffen, in water.

Als de controles laten zien dat de componenten in de vaccinproducten allemaal voldoende potent zijn en voldoen aan het productdossier vastgelegde eisen, zullen deze worden vrijgegeven voor gebruik in het veld.

Deze vaccins worden voornamelijk toegepast in edelpelsdieren ter voorkoming van de volgende endemische aandoeningen:

1.) Mink Enteritis Virus infectie: MEV is een parvovirus dat na een incubatietijd van 4 tot 7 dagen anorexia, overgeven en diarree (gepaard met slijm en soms bloed) veroorzaakt. De symptomen houden tussen de 4 tot 7 dagen aan. In jonge dieren (<3 maanden) zijn de symptomen over het algemeen ernstiger, dan in oudere dieren en is een mortaliteit van 80% of meer normaal.

2.) *Clostridium botulinum* infectie: *Clostridium botulinum* is een toxine producerende bacterie welke botulisme veroorzaakt. Symptomen zijn onder meer misselijkheid, overgeven, neurologische problemen, als: spierzwakte en verlamming. Zelfs bij lage dosis heeft deze ziekteverwekker het vermogen om grote mortaliteit te veroorzaken onder geïnfecteerden. Bij een uitbraak is een hoge mortaliteit (80% of meer) niet ongewoon.

3.) *Pseudomonas auruginosa* infectie: een bacteriële ziekteverwekker die in pelsdieren hemorragische pneumonie veroorzaakt, waarbij 50% of meer mortaliteit niet abnormaal blijkt.

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: Uitvoering van wettelijk verplichte controle testen conform de Europese Pharmacopoeia en de bij de overheid/EU gedeponeerde productdossiers.

Haalbaarheid: Testen zijn gevalideerd en reproduceerbaar uitvoerbaar.

3.3 Relevance

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

De werkzaamheid/potentie van vaccins wordt m.b.v. vaccinatie/challenge experiment getest. De controle testen zijn onderdeel van de vrijgifte controles van aantal van vaccinproducten. Zonder deze vaccinproducten zijn de doeldieren (beoogt verschillende soorten pelsdieren, hoofdzakelijk nertsen) overgeleverd aan de endemische ziekteverwekkers waartegen geënt wordt. Deze ziekteverwekkers zijn het Mink Enteritis virus, de *Clostridium*- en de *Pseudomonas* bacteriën. Wanneer de doeldieren in de houderij niet gevaccineerd zouden worden zou dit leiden tot 50% tot 90% sterfte onder voor een groot deel jonge dieren.

3.4 Research Strategy

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

De potentie van vaccins wordt getest door middel van vaccinatie-challenge experiment. Hierbij worden dieren met een werkend immuunsysteem gevaccineerd met het te onderzoeken vaccin, om vervolgens te testen of deze dieren beschermd zijn tegen een infectie met het bijbehorende ziekte verwekkende agens (de challenge). Dit is een algemeen geaccepteerde wijze om de werkzaamheid/potentie van vaccins te testen.

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.

Er zijn een drietal controle experimenten die worden uitgevoerd:

1. Mink Enteritis Virus potentietest in Nertsen;
2. *Clostridium* potentietest in Muizen;
3. *Pseudomonas* potentietest in Muizen.

In de bijlagen zullen de bovenstaande testen uitvoerig worden beschreven.

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

Het meest toegepaste vaccinproduct is trivalent, dit vaccin bevat alle drie de antigene componenten, hiermee wordt gevaccineerd tegen Mink Enteritis virus, *Clostridium* en *Pseudomonas*. Dit product zal om deze reden dan ook in alle drie de testen getest dienen te worden. Verder zijn er ook vaccinproducten die geformuleerd worden met een of twee van de bovengenoemde componenten, deze vaccins worden dan logischerwijs alleen getest voor de relevante componenten. Deze vaccins worden beperkt toegepast in geval van uitbraken van de betreffende ziekteverwekker.

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	Mink Enteritis potentietest in Nertsen
2	<i>Pseudomonas</i> vaccin potentietest in muizen
3	Botulisme vaccin potentie test in muizen

**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).
- 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.	Vaccin Controles

2 Categories

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

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Om de veiligheid en werkzaamheid/potentie van vaccinproducten voor mens en dier te garanderen, stellen overheden wereldwijd het verplicht dat deze producten gecontroleerd dienen te worden. In Europese Gemeenschap moet verplicht voldaan worden aan de voorschriften van de Europese Pharmacopoeia, besloten in EU Council Directive 81/852/EEC. In Nederland is dit vastgelegd in de Wet Dieren. Op de naleving van de bepalingen in de Wet Dieren ten aanzien van diergeneesmiddelen en de daaruit voortvloeiende eis van conformiteit aan de Europese Pharmacopoeia wordt toegezien door het Bureau Diergeneesmiddelen van het College ter Beoordeling van Geneesmiddelen. Veel van deze controles kunnen worden uitgevoerd *in vitro*, in het laboratorium, maar voor de controle van de werkzaamheid van vaccinproducten is het in het algemeen nodig om dit *in vivo*, in een dier uit te voeren. De voornaamste reden hiervoor is dat een vaccine werkt via het immuunsysteem van de gevaccineerde, omdat de werking van dit immuunsysteem zeer complex is en het niet mogelijk is na te bootsen of te simuleren.

Voor een aantal diervaccins voert het instituut deze controles uit voor vrijgifte in alle lidstaten van de EU waar deze vaccins zijn toegelaten. Zo wordt voorkomen dat de controles moeten worden uitgevoerd in elke afzonderlijke lidstaat.

De werkzaamheid/potentie van de volgende componenten van aantal gebruiksklare geformuleerde vaccinproducten worden gecontroleerd met een component specifieke potentie controle test:

- 1.) Mink Enteritis Virus gedood virus component;
- 2.) *Clostridium botulinum* Type C component;
- 3.) *Pseudomonas auruginosa* bacterin toxoid component.

De formulaties van gecontroleerde vaccinproducten bestaan uit een of meerdere van de bovenstaande componenten, met hierbij een aantal hulpstoffen, in water.

Als de controles laten zien dat de componenten in de vaccinproducten allemaal voldoende potent zijn en voldoen aan het productdossier vastgelegde eisen, zullen deze worden vrijgegeven voor gebruik in het veld.

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: Uitvoering van wettelijk verplichte controle testen conform de Europese Pharmacopoeia en de bij de overheid/EU gedeponeerde productdossiers.

Haalbaarheid: Testen zijn gevalideerd en reproduceerbaar uitvoerbaar.

3.3 Relevance

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

De werkzaamheid/potentie van vaccins wordt m.b.v. vaccinatie/challenge experiment getest. De controle testen zijn onderdeel van de vrijgifte controles van aantal van vaccinproducten. Zonder deze vaccinproducten zijn de doeldieren overgeleverd aan de endemische ziekteverwekkers waartegen geënt wordt. Deze ziekteverwekkers zijn het Mink Enteritis virus, de *Clostridium*- en de *Pseudomonas* bacteriën. Wanneer de doeldieren in de houderij niet gevaccineerd zouden worden zou dit leiden tot 50% tot 90% sterfte onder voor een groot deel jonge dieren.

3.4 Research Strategy

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

De potentie van vaccins wordt getest door middel van vaccinatie-challenge experiment. Hierbij worden dieren met een werkend immuunsysteem gevaccineerd met het te onderzoeken vaccin, om vervolgens te testen of deze dieren beschermd zijn tegen een infectie met het bijbehorende ziekte verwekkende agens (de challenge). Dit is een algemeen geaccepteerde wijze om de werkzaamheid/potentie van vaccins te testen.

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.

Er zijn een drietal controle experimenten die worden uitgevoerd:

1. Mink Enteritis Virus potentietest in Nertsen;
2. *Clostridium* potentietest in Muizen;
3. *Pseudomonas* potentietest in Muizen.

In de bijlagen zullen de bovenstaande testen uitvoerig worden beschreven.

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

Het meest toegepaste vaccinproduct is trivalent, dit vaccin bevat alle drie de antigene componenten, hiermee wordt gevaccineerd tegen Mink Enteritis virus, *Clostridium* en *Pseudomonas*. Dit product zal om deze reden dan ook in alle drie de testen getest dienen te worden. Verder zijn er ook vaccinproducten die geformuleerd worden met een of twee van de bovengenoemde componenten, deze vaccins worden dan logischerwijs alleen getest voor de relevante componenten. Deze vaccins worden beperkt toegepast in geval van uitbraken van de betreffende ziekteverwekker.

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	Mink Enteritis potentietest in Nertsen
2	Pseudomonas vaccin potentietest in muizen
3	Botulisme vaccin potentie test in muizen

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	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>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Mink Enteritis potentietest in Nertsen</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Mink Enteritis potentietest in Nertsen
Serial number	Type of animal procedure					
1	Mink Enteritis potentietest in Nertsen					

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.

Test wordt in nertsen (veel voorkomend doeldier) uitgevoerd zoals beschreven in geregistreerde productdossier volgens de geldende wettelijke normen, primaire uitkomstparameter is klinische verschijnselen van MEV infectie en uitscheiding van virus via faeces, welke door middel van virusisolatie en specifieke immuunkleuring wordt bevestigd.

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

Adaptatie:

d= -5 tot -3: Dieren worden opgehaald bij leverancier, gezondheidstoestand wordt bekeken en de dieren opgehokt.

Deel 1: Vaccinatie

- 1.) d=1: Dieren van test groep worden subcutaan (losse huid in oksel) geïnoculeerd met 1 ml test materiaal.
- 2.) d=1 t/m 14: Alle dieren worden 14 dagen dagelijks geobserveerd. Eventuele observaties worden vastgelegd, mochten er ongewenste reacties ten gevolge van de vaccinatie hebben plaatsgevonden dan wordt de batch afgekeurd en zal tweede deel niet plaatsvinden. Indien geconstateerd wordt bij observatie dat dieren complicaties ondervinden op inspuitlek dan zullen deze dieren van nabij worden onderzocht om de inspuitlek te controleren.

In deze 14 dagen zal de immuunrespons vorm krijgen en immunologisch geheugen worden opgebouwd tegen het vaccin.

Deel 2: Potentie MEV

- 1.) d=15: 1 ml orale dosis Mink Enteritis Virus (MEV) wordt m.b.v. canule in slokdarm gebracht.
- 2.) d=16 t/m 18: 1 ml dosis MEV in voedsel
- 3.) d= 20 t/m 23: Faeces per dier worden op dagen 5, 6 en 7 na challenge verzameld. Hieruit zal virus worden geïsoleerd om te bewijzen dat infectie daadwerkelijk heeft plaatsgevonden in de controledieren en dat deze uitblijft in de gevaccineerde dieren. Te beginnen met gevaccineerde dieren en vervolgens de controle dieren. Per dier nieuwe spatel om faeces op te scheppen en handschoenen dienen tussentijds te worden gewisseld om kruisbesmettingen te voorkomen. Materiaal wordt bij -20oC opgeslagen.
- 4.) d=15 t/m 28: Dieren worden dagelijks geobserveerd, observaties worden vastgelegd. Algemeen beeld gedragingen van de nerts wordt gescoord, toestand van faeces wordt gescoord, eventuele opmerkingen over water- en voedselafname worden opgetekend. Minimaal 80% (4/5) van de dieren van de ongevaccineerde controle groep dienen binnen 12 dagen na inoculatie symptomen van Mink Enteritis Virus infectie te vertonen. Indien dit niet plaatsvindt, moet de test als niet valide worden beschouwd (challenge is dan niet correct verlopen/sterk genoeg) en moet de complete test 1x worden herhaald.
- 5.) d=28: Dieren worden op dag 14 postchallenge (d=28) gesedeerd en vervolgens geëuthanaseerd,

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

Het streven is om een minimaal aantal van 4 parallelle assays per testronde te halen om een schaalvoordeel en daarmee samenhangende reductie van benodigde dieren te bewerkstelligen. Maximale aantal is 8 parallelle assays. Dit schaalvoordeel is dat er maar 5 negatieve controledieren nodig zijn voor de vrijgifte van 4 te controleren vaccinbatches. De opdrachtgever heeft vanuit dierwelzijns oogpunt toegezegd zoveel mogelijk te streven naar het laten parallel testen van zoveel mogelijk vaccine batches.

B. The animals

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

Herkomst

Mustela vison, SPF dieren (Vrij van MEV of immuunrespons tegen MEV) aangeleverd door Nederlandse Federatie van Edelpelsdierhouders. De Nederlandse federatie van Edelpelsdierhouders heeft bedrijven welke deze dieren met de gewenste status kunnen aanleveren. Er worden geen nertsen gefokt voor het doel als proefdier te dienen, het is daarom noodzakelijk om nertsen uit "praktijk" te betrekken. Hiertoe dient een art. 11 vrijstelling te worden aangevraagd bij de NVWA.\

Aantal

Voor het testen van 1 batch gebruiksklaar vaccin zijn de onderstaande dieren nodig:

5 dieren in test groep (gevaccineerd, met te testen vaccin)

5 dieren in controle groep (ongevaccineerd)

Bij meerdere batches zijn 5 dieren per vaccin batch nodig en blijft de controle groep gelijk. De testen zullen dan per voorkeur zodanig gepland worden dat er meerdere batches parallel worden getest, om zodoende te besparen op het aantal benodigde controle dieren.

In de periode van een jaar zullen naar schatting tussen de 30 en de 60 vaccinbatches in totaal getest moeten worden. Deze schatting van het aantal vaccinbatches kan lager uitvallen, kan echter ook ten gevolge van een meerproductie van vaccine om b.v. uitbraak te bestrijden, omhoog gaan. Het is daarnaast goed mogelijk dat door het groeiende aantal landen in Europa waar deze vaccins wordt toegepast het aantal batches in de toekomst zal gaan stijgen.

Het is gebleken, sinds 2009 tot nu, dat het nodig is om per 20 benodigde dieren 1 reservedier aan te schaffen. Het blijkt dat in de ergste gevallen in de adaptatieperiode tussen aankomst en de start van de experimenten ca. 5% van de dieren overlijdt. Uit sectie blijkt dat de redenen voor deze sterfte divers zijn, b.v. aangeboren afwijkingen, acute ziekte, etc.. Mink Enteritis Virus is een parvovirus. Dit is een familie van zeer besmettelijke en

resistente virussen. Het is vrijwel zeker dat de niet gevaccineerde reservedieren gedurende de challenge periode besmet worden. Dit maakt de dieren onbruikbaar voor de volgende vrijgifte testen.

Indien de schatting hierboven van het aantal batches wordt gehaald, dat wil zeggen 60 vaccin batches in totaal per jaar en de batches allemaal als enkele batch worden aangeboden om testen, betekent dit dat er 60 (vaccinbatches) x 10 (5 controle en 5 testgroep dieren) + 60 reservedieren = 660 proefdieren per jaar nodig zijn om vaccin vrijgifte te bewerkstelligen. Voor de aangevraagde periode van 5 jaar zou dat 660x5= 3300 dieren zijn.

Leeftijd

De praktijk leert dat de meeste vaccins batches in najaar en winter geproduceerd en getest worden en dat de meeste dieren dan ook oud genoeg zijn om weinig tot geen klinische verschijnselen te vertonen (tussen de 4 en 8 maanden). Echter is het vanwege uitbraken of productie-eisen soms nodig om eerder in het jaar te moeten testen, dan moet men noodgedwongen gebruik maken van jongere dieren.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mustula vision	Matig	3300	

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 door in vitro methoden is met de huidige stand van de wetenschap niet mogelijk, omdat de reactie van een levend wezen en in het bijzonder van het afweersysteem (immuunsysteem) op een vaccin, antiviraal middel of virus niet gesimuleerd kan worden. Vermindering: Het streven is om een minimaal aantal van 4 parallele assays per testronde te halen om een schaalvoordeel en daarmee samenhangende reductie van benodigde dieren te bewerkstelligen. Maximale aantal is 8 parallele assays. Dit schaalvoordeel is dat er maar 5 negatieve controledieren nodig zijn voor de vrijgifte van 4 of meer te controleren vaccinbatches. De opdrachtgever heeft vanuit dierwelzijns oogpunt toegezegd zoveel mogelijk te streven naar het laten parallel testen van zoveel mogelijk vaccine batches. Verfijning: Op dit moment is er geen verfijning mogelijk. Wel wordt er zorg voor gedragen, door procedures en training, dat er geen fouten worden gemaakt in de proefuitvoering, om zo goed mogelijk te voorkomen dat er geen proeven over gedaan moeten worden.

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

Biotechnische handelingen worden tot minimum beperkt. Sedatie wordt toegepast alvorens de dieren worden geëuthanaseerd. Proef vind plaats in BSL-2 dierverblijven, waarvan de uitgaande lucht HEPA M13 gefilterd wordt. Er is geen contact met de buitenwereld, en om deze reden is de kans op nadelige milieueffecten nihil.

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.

Deze controles dienen volgens EU in EU lidstaat plaats te vinden, voor deze vaccinproducten vinden de controles bij ons instituut plaats, dit is vastgelegd in de productdossiers, in principe kunnen andere partijen deze testen voor het beoogde doel van vaccin vrijgifte niet uitvoeren.

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.

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.

Analgesie en/of anesthesie wordt niet toegepast, omdat:

1.) Dit immuun status van dieren beïnvloed, hetgeen niet wenselijk is.

2.) Tevens zal anesthesie interfereren met de observatie van eventuele, ongewenste gedragingen van de dieren. 3.) Het ziekteverloop van de MEV infectie is bij de gebruikte oudere dieren mild (bij jonge dieren leidt MEV tot hoge sterfte, oudere dieren hebben een mild verloop) en daarom is pijnstilling niet nodig.

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?

* Alle biotechnische handelingen veroorzaken gering tot maximaal matig ongerief. Dit bestaat uit het vangen en fixeren van de dieren en het toedienen van vaccin d.m.v. injectie en toedienen van een orale dosis van MEV challenge materiaal. * MEV challenge leidt tot matig ongerief. Symptomen van ernstige MEV infectie zijn: anorexia, overgeven, faeces met witte/roze aanslag (slijm), diarree (roze of wit met slijm). Bij de volwassen dieren die in deze experimenten worden gebruikt en de toegepaste dosering van het virus zullen de klachten, naar verwachting, beperkt blijven tot de witte/roze faeces met slijm. * Gevaccineerde dieren ondervinden hoogstwaarschijnlijk geen enkel of zeer geringe ziekteverschijnselen, als de vaccins werken, daar de vaccins zeer effectief zijn gebleken door de jaren heen. Tot nu toe hebben nagenoeg geen van de gevaccineerde dieren symptomen getoond van MEV infectie, sporadisch komt een enkel dier voor met witte/roze faeces. * Euthanasie: Matig Ongerief.

Explain why these effects may emerge.

Biotechnische handelingen en besmetting met Mink Enteritis virus.

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

Aantal benodigde biotechnische handelingen wordt tot strikt noodzakelijk minimum beperkt. In veel gevallen zullen symptomen van de Mink Enteritis Virus infectie veelal mild of zelfs afwezig zijn, omdat in de gevaccineerde dieren de dieren beschermd worden (geen symptomen) en in de ongevaccineerde controle zal het ziekteverloop over het algemeen mild of afwezig zijn, omdat de dieren vaak oud genoeg zijn (4 maanden of ouder) om de nadelige effecten van de Mink Enteritis Virus infectie te weerstaan. Infectie en virusreplicatie worden dan door middel van de virusisolatie uit de faeces vastgesteld.

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.

In incidentele gevallen wordt gezien dat ongevaccineerde, controle dieren anorexia vertonen (in 2010 en 2012, was dit in beide jaren 1 dier). Als ten gevolge van aanhoudende anorexia de dieren verzwakken zal eerst water en voer op een makkelijker te bereiken plaats worden aangeboden. Als dit gebeurd nemen de biotechnici van DB contact op met onderzoeker. Als dan anorexia nog aanhoudt en de dieren verder verzwakken dan zal worden overgegaan tot euthanasie (sedatie met dormitor en injectie intracardiaal van T61, volgens bijgevoegde werkvoorschrift). Dieren die ten gevolge van ziekte/anorexia die enige dagen aanhoudt, zodanig verzwakken dat ze niet meer zelfstandig kunnen eten zullen zo spoedig mogelijk worden afgemaakt. Aanhoudende anorexia is het weigeren van voedsel en water, waardoor er een verslechtering van de conditie en gezondheid van het dier veroorzaakt wordt. Enige dagen is in ieder geval meer dan 3. Het concretiseren van de humane eindpunten is moeilijker dan op eerste gezicht lijkt, om deze redenen is er voor gekozen om het niet hard te definiëren. Nertsen worden 1x per jaar in de vroege lente geboren, de testen worden gedurende het jaar op dieren van voortschrijdende leeftijd. Daarnaast ontvangen we outbred dieren van wisselende bloedlijnen (en daarmee samenhangende fenotypen) en kwaliteit. Hierdoor is de spreiding van de reactie op niet drinken/eten tussen groepen dieren en individuele dieren enorm. Het komt voor dat er dieren (b.v. slechte kwaliteit of jong of dunner type) zijn die na 2 dagen anorexia al in zodanig slechte conditie zijn, dat in samenspraak tussen DB en onderzoeker wordt besloten over te gaan tot euthanasie. Andere dieren (oudere dieren van betere kwaliteit) kunnen wel 7 dagen zonder eten, voordat ze problemen krijgen, en er zitten er zelfs bij die in de gewenningsperiode zo een dag of 3 a 4 niet eten uit eigen beweging, om dan vervolgens een dag goed te schransen en het verder goed doen in de proef. Als er hard gedefinieerd wordt: 4 dagen niet eten en drinken, dan laat dat geen ruimte voor interpretatie ter plaatse, dus duidelijk. Het gevaar hiervan is dat het geregeld voor gaat komen dat dieren of te laat of onnodig worden geëuthanaseerd. Om deze reden heeft het mijn sterke voorkeur om het per individueel dier te bekijken om onnodig leed en uitval te voorkomen.

Indicate the likely incidence.

Minder dan 0.5%.

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).

In ergste geval: matig. Bij de gevaccineerde dieren is er sprake van bescherming, het virus wordt geneutraliseerd door immuunsysteem. In de meeste negatieve controledier groepen (vaak oudere dieren) verloopt de besmetting nagenoeg asymptomatisch. In de praktijk zijn het voornamelijk de jonge dieren (jonger dan 3 maanden) die ernstig ziek worden, een mortaliteit van 50-90% van de jonge dieren is niet ongewoon.

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.

De dieren zijn blootgesteld aan vaccin tegen Mink Enteritis Virus en het virus zelf, zijn hierdoor niet meer te gebruiken voor deze potentie test of andere immunologisch testen. Verder worden er geen andere experimentele handelingen uitgevoerd met deze diersoort.

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.
- 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 2	Type of animal procedure Pseudomonas vaccin potentietest in muizen

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.

Het doel van de *Pseudomonas* vaccin potentie test is uitvoering van de wettelijk verplichte controle op de werkzaamheid/potentie van vaccinproducten voor *Pseudomonas aeruginosa* serotypen 5, 6 en 7/8. De testopzet wordt uitgevoerd conform de bij de overheid gedeponeerde productdossiers voor deze vaccins. De opzet van de potentie test is gebaseerd op de statistische methode van Reed en Muench voor bepaling van de 50% eindpunt bepaling (L.J. Reed, H. Muench. A simple method of estimating fifty percent end points. Am J Hyg, 27 (1938), pp. 493-497). Voor iedere vaccin batch wordt hierbij de relatieve potentie van het vaccin bepaald ten opzichte van een standaard referentie vaccin. Dit wordt bepaald voor elk van de drie verschillende *Pseudomonas aeruginosa* serotypen 5, 6 en 7/8 waartegen het vaccin bescherming biedt. De mate van bescherming van het te testen vaccin wordt berekend aan de hand van de methode van Reed en Muench en dient daarbij gelijk aan of beter te zijn dan het referentie vaccin.

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

In de procedure wordt de te testen vaccin batch vergeleken met een referentie vaccin. De proefopzet bevat daarmee de volgende proefgroepen per serotype:

- Het referentie vaccin, in de verdunningen 10E-1, 10E-2 en 10E-3 voor serotypen 5 en 6. Voor serotype 7/8 wordt een afwijkende verdunningsreeks gebruikt: onverdund, 10E-0.8 en 10E-1.6.
- Het te testen vaccin voor de serotypen 5 en 6 in de verdunningen 10E-1, 10E-2 en 10E-3. Voor serotype 7/8 wordt een afwijkende verdunningsreeks gebruikt: onverdund, 10E-0.8 en 10E-1.6.
- Controlegroep, niet gevaccineerd.

Op dag 0 worden de muizen in de groepen van het referentie vaccin en de te testen batches gevaccineerd met 0.2 ml verdunt vaccin, subcutaan in de nek.

Op dag 14, 15 of 16 worden alle groepen intraperitoneaal (i.p.) geïnoculeerd met één van de drie serotypen van *Pseudomonas aeruginosa* in een dosis van 10E6 - 10E7 colony forming units (CFU).

Vanaf de dag van challenge worden gedurende 3 dagen de muizen tweemaal daags beoordeeld en het aantal geëthanaseerde en dode muizen wordt geregistreerd. Op dag 4 en 5 worden de muizen één maal per dag beoordeeld. Uit ervaring blijkt dat de ziekteverschijnselen alleen optreden in de eerste twee dagen na challenge.

Op dag 19, 20 of 21 (5 dagen na dag 14, 15 of 16) is de test afgerond en worden alle nog levende muizen geëthanaseerd.

De resultaten worden verwerkt waarbij de toegediende challenge dosis wordt berekend aan de hand van een kiemtellingen. Voor een valide 50% eindpunt volgens Reed-Muench dient aan het einde van de test aan de onderstaande criteria te worden voldaan:

- Het referentie vaccin geeft meer dan ($>$) 50% bescherming in de laagste verdunning van het vaccin.
- Het referentie vaccin geeft minder dan ($<$) 50% bescherming in de hoogste verdunning van het vaccin.
- Het sterfte patroon van de verdunningen bij de referentie muizen en test muizen is lineair. Dat wil zeggen dat elke opeenvolgende verdunning van het vaccin een gelijk of groter aantal HEP/doden heeft dan de vorige verdunning.

De mate van bescherming van het te testen vaccin wordt vervolgens berekend aan de hand van de Reed-Muench 50% eindpunt bepaling.

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

Uitgangspunt voor de testprocedure voor toelating van de vaccins op de Nederlandse markt is in het verleden de test geweest zoals beschreven in de USDA-procedure voor toelating van de betreffende vaccins op de Amerikaanse markt. Hierin wordt een groter aantal dieren per groep gebruikt en een terug titratie van de challenge dosis uitgevoerd in muizen. Uit het oogpunt van terugdringen proefdiergebruik is voor toelating op de Nederlandse en Europese markt gekozen het aantal muizen per groep terug te brengen van 20 naar 10 en wordt ook de terug titratie *in vitro* uitgevoerd. Op deze wijze is de test opgenomen in de dossierregistratie.

Pseudomonas aeruginosa is een opportunistische kiem. Hierdoor is het verloop van het ziektebeeld minder voorspelbaar dan bijvoorbeeld bij *C. botulinum* toxine en zit er meer variatie in de respons. De testopzet en berekeningen zijn gebaseerd op de statistische Reed-Muench 50% eindpuntbepaling. Zoals boven beschreven moet voor een valide Reed-Muench eindpuntbepaling aan een aantal criteria worden voldaan. Bij kleinere aantallen dieren per groep zal de robuustheid van de test afnemen en het aantal testen toenemen waarbij de test niet meer voldoet aan de criteria voor de Reed-Meunch 50% eindpuntbepaling.

B. The animals

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

Muizen (*mus musculus*) zijn gevoelig voor de drie gebruikte *Pseudomonas aeruginosa* stammen en daarom geschikt voor de vaccin potentie test voor *Pseudomonas*. De gebruikte muizen zijn

Oncins France 1 muizen (OF-1) of dieren van een andere, vergelijkbare, muizenstam.

Pseudomonas is een opportunistische kiem waarbij de response minder voorspelbaar is dan bijvoorbeeld in de Botulisme potentie test, met meer variatie in de response. Voor dit type experimenten worden vrouwelijke muizen gebruikt. De reden is dat mannelijke muizen een aantal kenmerken hebben die de resultaten van dit soort experimenten negatief beïnvloeden. Mannelijke muizen vertonen agressief gedrag en vechten met elkaar. Dit leidt o.a. tot stress (hetgeen leidt tot verhoogde cortisol niveaus die een nadelig effect hebben op het immuunsysteem, wat weer leidt tot lagere

effectiviteit van de vaccins). In het geval dat men zowel vrouwtjes als mannetjes zou gebruiken, zouden deze zaken zorgen voor een grotere spreiding van de uitkomsten van de experimenten, en om tot significante resultaten te komen, is het dan noodzakelijk om grotere hoeveelheden muizen per experiment te benutten. Om het aantal dieren beperkter te houden is er voor gekozen om alleen vrouwtjes in te zetten.

Per groep worden 30 (10 muizen per verdunning, 3 verdunningen) muizen gebruikt. Gestreefd wordt om per proef 6 vaccin batches tegelijk te testen zodat in verhouding minder referentie en controle muizen gebruikt worden ten opzichte van het aantal te testen batches. Bij 6 vaccin batches bestaat het aantal gebruikte muizen dan uit 30 x 3 serotypen voor het referentie vaccin, 6 x 30 x 3 voor de 6 te testen batches en 10 x 3 controle muizen voor de challenge. In totaal 660 muizen. Voor deze Pseudomonas potentie test aanvraag wordt de komende jaren uitgegaan van 60 vaccin batches verdeeld over 10 potentie testen op jaarbasis. Dit komt neer op maximaal 6600 muizen per jaar.

Opm. i.v.m. met vraag door CCD: Op basis van de behoefte aan vaccin worden batches ter controle aangeboden door de fabrikant. De behoefte aan vaccin is evenredig aan het aantal te vaccineren dieren. Als het aantal dieren dat gevaccineerd moet worden daalt, zal de hoeveelheid te testen vaccines dalen en daarmee het aantal proefdieren dat hiervoor nodig is.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mus musculus	Matig	33000	

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: - Er is geen alternatieve test beschikbaar die de mate van bescherming weergeeft voor het Pseudomonas vaccin. Daarmee is het niet mogelijk om de challenge test uit te voeren in vitro. Daarnaast is het wettelijk verplicht om controle op de werkzaamheid/potentie van vaccinproducten uit te voeren en is de potentie test conform het bij de overheid gedeponeerde registratiedossier voor deze vaccins. Vermindering: - De potentie test wordt altijd met meerdere batches tegelijkertijd ingezet. Doordat maar één referentie groep en één controle groep nodig voor meerdere vaccin batches levert dit een besparing oplevert in het aantal benodigde muizen. Vanuit de historie is gebleken dat Pseudomonas potentie testen met 1 referentie en 6 te testen vaccin batches een uitvoerbaar zijn zonder dat daarbij de kwaliteit van de uitgevoerde test in het geding komt. Verfijning: - Een humaan eindpunt wordt toegepast bij de muizen welke klinische verschijnselen tonen ten gevolge van de challenge met Pseudomonas aeruginosa. - Om het welzijn van de muizen te vergroten wordt kooiverrijking toegepast.

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

Muizen die verschijnselen vertonen ten gevolge van een infectie met Pseudomonas aeruginosa (lethargie en bol zitten, etc.) worden zo spoedig mogelijk geëuthanaseerd. Ook wanneer de muizen andere verschijnselen vertonen als beschreven in de Code Humane Eindpunten (zie onder J) worden de muizen direct geëuthanaseerd.

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.

Deze controles dienen volgens EU in EU lidstaat plaats te vinden, voor deze vaccinproducten vinden de controles bij ons instituut plaats, dit is vastgelegd in de productdossiers.

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.

H. Pain and pain relief

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

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

Een deel van de dieren uit de vaccinatiegroepen en de controledieren zullen een septicaemie ontwikkelen t.g.v. een infectie met *Pseudomonas aeruginosa*. Dit leidt in over het algemeen binnen 24-48 uur tot de dood en gaat gepaard met bol zitten, lethargie, ooguitvloeiing, niet eten, niet drinken, zware schokkende ademhaling. Uiteindelijk resulterend in zwaar ademen, niet meer op de omgeving reageren. De dieren worden geëuthanaseerd voordat dit stadium wordt bereikt. Dit houdt in dat dieren bij lethargie en bol zitten worden geëuthanaseerd. In verband met het snelle verloop van de ziekte en het uitvoeren van euthanasie voordat ernstige verschijnselen optreden, wordt het niet zinvol geacht om pijnbestrijding toe te passen. Daarnaast beïnvloed pijnbestrijding de immuunrespons, hetgeen niet wenselijk wordt geacht gezien de aard van het experiment.

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?

* Op dag 0 worden de dieren gevaccineerd; dit geeft een gering ongerief. * Op dag 14, 15 of 16 vindt challenge plaats met een *Pseudomonas aeruginosa* concentratie; het injecteren geeft ongerief en een deel van de muizen uit de vaccinatiegroepen en de controledieren zullen een septicaemie ontwikkelen ten gevolge van een infectie met *Pseudomonas aeruginosa*. Dit leidt in over het algemeen binnen 24 uur tot de dood en gaat gepaard met bol zitten, lethargie, ooguitvloeiing, niet eten, niet drinken, zware schokkende ademhaling. * Euthanasie: gering ongerief.

Explain why these effects may emerge.

Het ontwikkelen van een septicaemie ten gevolge van de challenge met *Pseudomonas aeruginosa*.

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

Uitvoeren van humaan eindpunt bij muizen waarbij lethargie en bol zitten wordt waargenomen.

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.

Een humaan eind punt wordt toegepast bij de muizen welke klinische verschijnselen tonen ten gevolge van de challenge met *Pseudomonas aeruginosa*. Verschijnselen hiervan zijn bol zitten, lethargie, ooguitvloeiing, niet eten, niet drinken, zware schokkende ademhaling. Uiteindelijk resulterend in zwaar ademen, niet meer op de omgeving reageren. De muizen worden geëuthanaseerd voordat dit stadium wordt bereikt. Dit houdt in dat dieren bij lethargie en bol zitten worden geëuthanaseerd. Ook wanneer de muizen andere verschijnselen vertonen zoals beschreven in de door de dierverzorging gehanteerde Code Human Eindpunten worden de dieren geëuthanaseerd. Uit de Code Humane Eindpunten: Klinische symptomen en voorwaarden waarop tot het toepassen van humane eindpunten dient te worden overgegaan. 1. Elke conditie die resulteert in een lange en onomkeerbare periode waarin het dier niet kan eten of drinken b.v. - langdurige immobiliteit - obstructie van de mondholte -

geen gebit of slecht functionerend gebit 2. Ziekten of condities die aangeven dat er ernstig pijn, lijden en ongemak wordt ondergaan - fracturen - zelfverwonding - abnormale stemgeluiden - abnormale houding of beweging - open wonden of zweren 3.

Snel of voortgaand gewichtsverlies b.v. 20% of meer gedurende een paar dagen of gradueel maar voortgaand gewichtsverlies 4 Minder verzorgingsgedrag (grooming) en abnormaal gedrag gedurende langere tijd b.v. ruw in de haren, haaruitval, langdurig diarree, verkleuring huid en haar door urineverlies, zwellingen aan de poten, verlamming of andere door CZS of perifere zenuwen veroorzaakte uitvalsverschijnselen (stuipen, draaibewegingen) 5 Ernstige of voortdurende respiratoire verschijnselen b.v. hoesten, niezen, neusuitvloeiing, bloed in neusschelp of bek. 6

Bloedingen, bloedarmoede of ongewone en ongebruikelijke uitvloeiingen 7 Aanwijzingen van microbiële infecties of andere ziekten, zeker als deze zullen interfereren met het experimentele protocol of worden veroorzaakt door bovengenoemde aandoeningen

Indicate the likely incidence.

De muizen in groep met de laagste verdunning van het vaccin (10E-1 of onverdund) zullen redelijk beschermd zijn tegen *Pseudomonas*. De serotypen van *Pseudomonas* verschillen in virulentie en de bescherming van het vaccin verschilt dan ook iets per serotype. In de laagste verdunning zal gemiddeld genomen geen van de muizen blootgesteld aan serotype 5 ziek worden, gemiddeld drie van de groep muizen blootgesteld aan serotype 6 en gemiddeld 1 van muis blootgesteld van serotype 7/8. De muizen in de volgende verdunning (10E-2 of 10E-0.8) zijn slechts gedeeltelijk beschermd zijn tegen *Pseudomonas*. Voor de serotypen 5, 6, 7/8 worden van de 10 muizen per groep respectievelijk 3, 5 en 4 ziek. En van de hoogste verdunning (10E-3 of 10E-1.6) zijn dat gemiddeld genomen 7 muizen voor alle serotypen. De muizen in de controle groep worden niet gevaccineerd en zullen niet beschermd zijn tegen *Pseudomonas*. Gemiddeld genomen worden 8 tot 9 van de muizen uit de controle groep ziek en krijgt een HEP of sterft. Overall komt gemiddeld genomen in een proefopzet met 6 te testen vaccin batches 82% (serotype 5), 56% (serotype 6) en 76% (serotype 7/8) in aanmerking voor HEP of is al voortijdig overleden.

K. Classification of severity of procedures

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

De muizen die voldoende beschermt zijn door het vaccin ondergaan een gering tot matig ongerief. Deze muizen zijn blootgesteld aan, hanteren, vaccinatie procedure en challenge. Daarentegen krijgen de muizen welke onvoldoende zijn beschermt tegen de infectie te maken met ernstig ongerief. Dit zijn de controle muizen (alleen challenge) maar ook de muizen welke gevaccineerd worden, recht evenredig met de verdunning van het vaccin. Over het geheel genomen ondervindt 59% van de muizen een gering ongerief (euthanasie aan het einde van de proef), 14% ondergaat een matig ongerief (HEP) en 27% ernstig ongerief (overlijdt in de proef).

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.

De overgebleven muizen zullen aan het einde van het experiment worden geëthanaseerd. Met uitzondering van de controle groep zijn de muizen gevaccineerd en hebben alle muizen een challenge gehad met *Pseudomonas aeruginosa* en zijn daarom niet meer geschikt om in een andere proef gebruikt te 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.

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.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Mink Enteritis potentietest in Nertsen

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.

Test wordt in nertsen (veel voorkomend doeldier) uitgevoerd zoals beschreven in geregistreerde productdossier volgens de geldende wettelijke normen, primaire uitkomstparameter is klinische verschijnselen van MEV infectie en uitscheiding van virus via faeces, welke door middel van virusisolatie en specifieke immuunkleuring wordt bevestigd.

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

Adaptatie:

d= -5 tot -3: Dieren worden opgehaald bij leverancier, gezondheidstoestand wordt bekeken en de dieren opgehokt.

Deel 1: Vaccinatie

1.) d=1: Dieren van test groep worden subcutaan (losse huid in oksel) geïnoculeerd met 1 ml test materiaal.

2.) d=1 t/m 14: Alle dieren worden 14 dagen dagelijks geobserveerd. Eventuele observaties worden vastgelegd, mochten er ongewenste reacties ten gevolge van de vaccinatie hebben plaatsgevonden dan wordt de batch afgekeurd en zal tweede deel niet plaatsvinden. Indien geconstateerd wordt bij observatie dat dieren complicaties ondervinden op inspuitlek dan zullen deze dieren van nabij worden onderzocht om de inspuitlek te controleren.

In deze 14 dagen zal de immuunrespons vorm krijgen en immunologisch geheugen worden opgebouwd tegen het vaccin.

Deel 2: Potentie MEV

1.) d=15: 1 ml orale dosis Mink Enteritis Virus (MEV) wordt m.b.v. canule in slokdarm gebracht.

2.) d=16 t/m 18: 1 ml dosis MEV in voedsel

3.) d= 20 t/m 23: Faeces per dier worden op dagen 5, 6 en 7 na challenge verzameld. Hieruit zal virus worden geïsoleerd om te bewijzen dat infectie daadwerkelijk heeft plaatsgevonden in de controledieren en dat deze uitblijft in de gevaccineerde dieren. Te beginnen met gevaccineerde dieren en vervolgens de controle dieren. Per dier nieuwe spatel om faeces op te scheppen en handschoenen dienen tussentijds te worden gewisseld om kruisbesmettingen te voorkomen. Materiaal wordt bij -20°C opgeslagen.

4.) d=15 t/m 28: Dieren worden dagelijks geobserveerd, observaties worden vastgelegd. Algemeen beeld gedragingen van de nerts wordt gescoord, toestand van faeces wordt gescoord, eventuele opmerkingen over water- en voedselafname worden opgetekend.

Minimaal 80% (4/5) van de dieren van de ongevaccineerde controle groep dienen binnen 12 dagen na inoculatie symptomen van Mink Enteritis Virus infectie te vertonen. Indien dit niet plaatsvindt, moet de test als niet valide worden beschouwd (challenge is dan niet correct verlopen/sterk genoeg) en moet de complete test 1x worden herhaald.

5.) d=28: Dieren worden op dag 14 postchallenge (d=28) gesedeerd en vervolgens geëuthanaseerd,

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

Het streven is om een minimaal aantal van 4 parallele assays per testronde te halen om een schaalvoordeel en daarmee samenhangende reductie van benodigde dieren te bewerkstelligen. Maximale aantal is 8 parallele assays. Dit schaalvoordeel is dat er maar 5 negatieve controledieren nodig zijn voor de vrijgifte van 4 te controleren vaccinbatches. De opdrachtgever heeft vanuit dierwelzijns oogpunt toegezegd zoveel mogelijk te streven naar het laten parallel testen van zoveel mogelijk vaccine batches.

B. The animals

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

Herkomst

Mustela vison, SPF dieren (Vrij van MEV of immuunrespons tegen MEV) aangeleverd door Nederlandse Federatie van Edelpelsdierhouders. De Nederlandse federatie van Edelpelsdierhouders heeft bedrijven welke deze dieren met de gewenste status kunnen aanleveren. Er worden geen nertsen gefokt voor het doel als proefdier te dienen, het is daarom noodzakelijk om nertsen uit "praktijk" te betrekken. Hiertoe dient een art. 11 vrijstelling te worden aangevraagd bij de NVWA.\

Aantal

Voor het testen van 1 batch gebruiksklaar vaccin zijn de onderstaande dieren nodig:

5 dieren in test groep (gevaccineerd, met te testen vaccin)

5 dieren in controle groep (ongevaccineerd)

Bij meerdere batches zijn 5 dieren per vaccin batch nodig en blijft de controle groep gelijk. De testen zullen dan per voorkeur zodanig gepland worden dat er meerdere batches parallel worden getest, om zodoende te besparen op het aantal benodigde controle dieren.

In de periode van een jaar zullen naar schatting tussen de 30 en de 60 vaccinbatches in totaal getest moeten worden. Deze schatting van het aantal vaccinbatches kan lager uitvallen, kan echter ook ten gevolge van een meerproductie van vaccine om b.v. uitbraak te bestrijden, omhoog gaan. Het is daarnaast goed mogelijk dat door het groeiende aantal landen in Europa waar deze vaccins wordt toegepast het aantal batches in de toekomst zal gaan stijgen.

Het is gebleken, sinds 2009 tot nu, dat het nodig is om per 20 benodigde dieren 1 reservedier aan te schaffen. Het blijkt dat in de ergste gevallen in de adaptatieperiode tussen aankomst en de start van de experimenten ca. 5% van de dieren overlijdt. Uit sectie blijkt dat de redenen voor deze sterfte divers zijn, b.v. aangeboren afwijkingen, acute ziekte, etc.. Mink Enteritis Virus is een parvovirus. Dit is een familie van zeer besmettelijke en

resistente virussen. Het is vrijwel zeker dat de niet gevaccineerde reservedieren gedurende de challenge periode besmet worden. Dit maakt de dieren onbruikbaar voor de volgende vrijgifte testen.

Indien de schatting hierboven van het aantal batches wordt gehaald, dat wil zeggen 60 vaccin batches in totaal per jaar en de batches allemaal als enkele batch worden aangeboden om testen, betekent dit dat er 60 (vaccinbatches) x 10 (5 controle en 5 testgroep dieren) + 60 reservedieren = 660 proefdieren per jaar nodig zijn om vaccin vrijgifte te bewerkstelligen. Voor de aangevraagde periode van 5 jaar zou dat $660 \times 5 = 3300$ dieren zijn.

Leeftijd

De praktijk leert dat de meeste vaccins batches in najaar en winter geproduceerd en getest worden en dat de meeste dieren dan ook oud genoeg zijn om weinig tot geen klinische verschijnselen te vertonen (tussen de 4 en 8 maanden). In principe zullen er geen dieren jonger dan 4 maanden gebruikt worden. Echter is het vanwege uitbraken of productie-eisen soms nodig om eerder in het jaar te moeten testen, dan moet men noodgedwongen gebruik maken van jongere dieren.

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 door in vitro methoden is met de huidige stand van de wetenschap niet mogelijk, omdat de reactie van een levend wezen en in het bijzonder van het afweersysteem (immuunsysteem) op een vaccin, antiviraal middel of virus niet gesimuleerd kan worden. Vermindering: Het streven is om een minimaal aantal van 4 parallele assays per testronde te halen om een schaalvoordeel en daarmee samenhangende reductie van

benodigde dieren te bewerkstelligen. Maximale aantal is 8 parallelle assays. Dit schaalvoordeel is dat er maar 5 negatieve controledieren nodig zijn voor de vrijgifte van 4 of meer te controleren vaccinbatches. De opdrachtgever heeft vanuit dierwelzijns oogpunt toegezegd zoveel mogelijk te streven naar het laten parallel testen van zoveel mogelijk vaccine batches. Verfijning: Op dit moment is er geen verfijning mogelijk. Wel wordt er zorg voor gedragen, door procedures en training, dat er geen fouten worden gemaakt in de proefuitvoering, om zo goed mogelijk te voorkomen dat er geen proeven over gedaan moeten worden.

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

Biotechnische handelingen worden tot minimum beperkt. Sedatie wordt toegepast alvorens de dieren worden geëuthanaseerd. Proef vind plaats in BSL-2 dierverblijven, waarvan de uitgaande lucht HEPA M13 gefilterd wordt. Er is geen contact met de buitenwereld, en om deze reden is de kans op nadelige milieueffecten nihil.

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.

Deze controles dienen volgens EU in EU lidstaat plaats te vinden, voor deze vaccinproducten vinden de controles bij ons instituut plaats, dit is vastgelegd in de productdossiers, in principe kunnen andere partijen deze testen voor het beoogde doel van vaccin vrijgifte niet uitvoeren.

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.

Analgesie en/of anesthesie wordt niet toegepast, omdat:

1.) Dit immuun status van dieren beïnvloed, hetgeen niet wenselijk is.

2.) Tevens zal anesthesie interfereren met de observatie van eventuele, ongewenste gedragingen van de dieren.3.) Het ziekteverloop van de MEV infectie is bij de gebruikte oudere dieren mild (bij jonge dieren leidt MEV tot hoge sterfte, oudere dieren hebben een mild verloop) en daarom is pijnstilling niet nodig.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

* Alle biotechnische handelingen veroorzaken gering tot maximaal matig ongerief. Dit bestaat uit het vangen en fixeren van de dieren en het toedienen van vaccin d.m.v. injectie en toedienen van een orale dosis van MEV challenge materiaal. * MEV challenge leidt tot matig ongerief. Symptomen van ernstige MEV infectie zijn: anorexia, overgeven, faeces met witte/roze aanslag (slijm), diarree (roze of wit met slijm). Bij de volwassen dieren die in deze experimenten worden gebruikt en de toegepaste dosering van het virus zullen de klachten, naar verwachting, beperkt blijven tot de witte/roze faeces met slijm. * Gevaccineerde dieren ondervinden hoogstwaarschijnlijk geen enkel of zeer geringe ziekteverschijnselen, als de vaccins werken, daar de vaccins zeer effectief zijn gebleken door de jaren heen. Tot nu toe hebben nagenoeg geen van de gevaccineerde dieren symptomen getoond van MEV infectie, sporadisch komt een enkel dier voor met witte/roze faeces. * Euthanasie: Matig Ongerief.

Explain why these effects may emerge.

Biotechnische handelingen en besmetting met Mink Enteritis virus.

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

Aantal benodigde biotechnische handelingen wordt tot strikt noodzakelijk minimum beperkt. In veel gevallen zullen symptomen van de Mink Enteritis Virus infectie veelal mild of zelfs afwezig zijn, omdat in de gevaccineerde dieren de dieren beschermd worden (geen symptomen) en in de ongevaccineerde controle zal het ziekteverloop over het algemeen mild of afwezig zijn, omdat de dieren vaak oud genoeg zijn (4 maanden of ouder) om de nadelige effecten van de Mink Enteritis Virus infectie te weerstaan. Infectie en virusreproductie worden dan door middel van de virusisolatie uit de faeces vastgesteld.

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.

In incidentele gevallen wordt gezien dat ongevaccineerde, controle dieren anorexia vertonen (in 2010 en 2012, was dit in beide jaren 1 dier). Als ten gevolge van aanhoudende anorexia de dieren verzwakken zal eerst water en voer op een makkelijker te bereiken plaats worden aangeboden. Als dit gebeurd nemen de biotechnici van DB contact op met onderzoeker. Als dan anorexia nog aanhoudt en de dieren verder verzwakken dan zal worden overgegaan tot euthanasie (sedatie met dormitor en injectie intracardiaal van T61, volgens bijgevoegde werkvoorschrift). Dieren die ten gevolge van ziekte/anorexia die enige dagen aanhoudt, zodanig verzwakken dat ze niet meer zelfstandig kunnen eten zullen zo spoedig mogelijk worden afgemaakt. Aanhoudende anorexia is het weigeren van voedsel en water, waardoor er een verslechtering van de conditie en gezondheid van het dier veroorzaakt wordt. Enige dagen is in ieder geval meer dan 3. Het concretiseren van de humane eindpunten is moeilijker dan op eerste gezicht lijkt, om deze redenen is er voor gekozen om het niet hard te definiëren. Nertsen worden 1x per jaar in de vroege lente geboren, de testen worden gedurende het jaar op dieren van voortschrijdende leeftijd. Daarnaast ontvangen we outbred dieren van wisselende bloedlijnen (en daarmee samenhangende fenotypen) en kwaliteit. Hierdoor is de spreiding van de reactie op niet drinken/eten tussen groepen dieren en individuele dieren enorm. Het komt voor dat er dieren (b.v. slechte kwaliteit of jong of dunner type) zijn die na 2 dagen anorexia al in zodanig slechte conditie zijn, dat in samenspraak tussen DB en onderzoeker wordt besloten over te gaan tot euthanasie. Andere dieren (oudere dieren van betere kwaliteit) kunnen wel 7 dagen zonder eten, voordat ze problemen krijgen, en er zitten er zelfs bij die in de gewenningsperiode zo een dag of 3 a 4 niet eten uit eigen beweging, om dan vervolgens een dag goed te schransen en het verder goed doen in de proef. Als er hard gedefinieerd wordt: 4 dagen niet eten en drinken, dan laat dat geen ruimte voor interpretatie ter plaatse, dus duidelijk. Het gevaar hiervan is dat het geregeld voor gaat komen dat dieren of te laat of onnodig worden geëuthanaseerd. Om deze reden heeft het mijn sterke voorkeur om het per individueel dier te bekijken om onnodig leed en uitval te voorkomen.

Indicate the likely incidence.

Minder dan 0.5%.

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).

In ergste geval: matig. Bij de gevaccineerde dieren is er sprake van bescherming, het virus wordt geneutraliseerd door immuunsysteem. In de meeste negatieve controledier groepen (vaak oudere dieren) verloopt de besmetting nagenoeg asymptomatisch. Jonge dieren in de negatieve, ongevaccineerde controlegroep zullen nadelige gevolgen van challenge ondervinden, met name verlies van eetlust, lusteloosheid en bloederige diarree, de ernst van het ongerief kan dan oplopen tot ernstig. Matig: 99.5% Ernstig:

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.

De dieren zijn blootgesteld aan vaccin tegen Mink Enteritis Virus en het virus zelf, zijn hierdoor niet meer te gebruiken voor deze potentie test of andere immunologisch testen. Verder worden er geen andere experimentele handelingen uitgevoerd met deze diersoort.

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.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure Pseudomonas vaccini potentietest in muizen

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.

Het doel van de *Pseudomonas* vaccin potentie test is uitvoering van de wettelijk verplichte controle op de werkzaamheid/potentie van vaccinproducten voor *Pseudomonas aeruginosa* serotypen 5, 6 en 7/8. De testopzet wordt uitgevoerd conform de bij de overheid gedeponeerde productdossiers voor deze vaccins. De opzet van de potentie test is gebaseerd op de statistische methode van Reed en Muench voor bepaling van de 50% eindpunt bepaling (L.J. Reed, H. Muench. A simple method of estimating fifty percent end points. Am J Hyg, 27 (1938), pp. 493-497). Voor iedere vaccin batch wordt hierbij de relatieve potentie van het vaccin bepaald ten opzichte van een standaard referentie vaccin. Dit wordt bepaald voor elk van de drie verschillende *Pseudomonas aeruginosa* serotypen 5, 6 en 7/8 waartegen het vaccin bescherming biedt. De mate van bescherming van het te testen vaccin wordt berekend aan de hand van de methode van Reed en Muench en dient daarbij gelijk aan of beter te zijn dan het referentie vaccin.

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

In de procedure wordt de te testen vaccin batch vergeleken met een referentie vaccin. De proefopzet bevat daarmee de volgende proefgroepen per serotype:

- Het referentie vaccin, in de verdunningen 10E-1, 10E-2 en 10E-3 voor serotypen 5 en 6. Voor serotype 7/8 wordt een afwijkende verdunningsreeks gebruikt: onverdund, 10E-0.8 en 10E-1.6.
- Het te testen vaccin voor de serotypen 5 en 6 in de verdunningen 10E-1, 10E-2 en 10E-3. Voor serotype 7/8 wordt een afwijkende verdunningsreeks gebruikt: onverdund, 10E-0.8 en 10E-1.6.
- Controlegroep, niet gevaccineerd.

Op dag 0 worden de muizen in de groepen van het referentie vaccin en de te testen batches gevaccineerd met 0.2 ml verdunt vaccin, subcutaan in de nek.

Op dag 14, 15 of 16 worden alle groepen intraperitoneaal (i.p.) geïnoculeerd met één van de drie serotypen van *Pseudomonas aeruginosa* in een dosis van 10E6 - 10E7 colony forming units (CFU).

Vanaf de dag van challenge worden gedurende 3 dagen de muizen tweemaal daags beoordeeld en het aantal geëuthanaseerde en dode muizen wordt geregistreerd. Op dag 4 en 5 worden de muizen één maal per dag beoordeeld. Uit ervaring blijkt dat de ziekteverschijnselen alleen optreden in de eerste twee dagen na challenge.

Op dag 19, 20 of 21 (5 dagen na dag 14, 15 of 16) is de test afgerond en worden alle nog levende muizen geëuthanaseerd.

De resultaten worden verwerkt waarbij de toegediende challenge dosis wordt berekend aan de hand van een kiemtellingen. Voor een valide 50% eindpunt volgens Reed-Muench dient aan het einde van de test aan de onderstaande criteria te worden voldaan:

- Het referentie vaccin geeft meer dan (>) 50% bescherming in de laagste verdunning van het vaccin.
- Het referentie vaccin geeft minder dan (<) 50% bescherming in de hoogste verdunning van het vaccin.
- Het sterfte patroon van de verdunningen bij de referentie muizen en test muizen is lineair. Dat wil zeggen dat elke opeenvolgende verdunning van het vaccin een gelijk of groter aantal HEP/doden heeft dan de vorige verdunning.

De mate van bescherming van het te testen vaccin wordt vervolgens berekend aan de hand van de Reed-Muench 50% eindpunt bepaling.

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

Uitgangspunt voor de testprocedure voor toelating van de vaccins op de Nederlandse markt is in het verleden de test geweest zoals beschreven in de USDA-procedure voor toelating van de betreffende vaccins op de Amerikaanse markt. Hierin wordt een groter aantal dieren per groep gebruikt en een terug titratie van de challenge dosis uitgevoerd in muizen. Uit het oogpunt van terugdringen proefdiergebruik is voor toelating op de Nederlandse en Europese markt gekozen het aantal muizen per groep terug te brengen van 20 naar 10 en wordt ook de terug titratie *in vitro* uitgevoerd. Op deze wijze is de test opgenomen in de dossierregistratie.

Pseudomonas aeruginosa is een opportunistische kiem. Hierdoor is het verloop van het ziektebeeld minder voorspelbaar dan bijvoorbeeld bij *C. botulinum* toxine en zit er meer variatie in de respons. De testopzet en berekeningen zijn gebaseerd op de statistische Reed-Muench 50% eindpuntbepaling. Zoals boven beschreven moet voor een valide Reed-Muench eindpuntbepaling aan een aantal criteria worden voldaan. Bij kleinere aantallen dieren per groep zal de robuustheid van de test afnemen en het aantal testen toenemen waarbij de test niet meer voldoet aan de criteria voor de Reed-Meunch 50% eindpuntbepaling.

B. The animals

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

Muizen (*mus musculus*) zijn gevoelig voor de drie gebruikte *Pseudomonas aeruginosa* stammen en daarom geschikt voor de vaccin potentie test voor *Pseudomonas*. De gebruikte muizen zijn

Oncins France 1 muizen (OF-1) of dieren van een andere, vergelijkbare, muizenstam.

Pseudomonas is een opportunistische kiem waarbij de response minder voorspelbaar is dan bijvoorbeeld in de Botulisme potentie test, met meer variatie in de response. Voor dit type experimenten worden vrouwelijke muizen gebruikt. De reden is dat mannelijke muizen een aantal kenmerken hebben die de resultaten van dit soort experimenten negatief beïnvloeden. Mannelijke muizen vertonen agressief gedrag en vechten met elkaar. Dit leidt o.a. tot stress (hetgeen leidt tot verhoogde cortisol niveaus die een nadelig effect hebben op het immuunsysteem, wat weer leidt tot lagere effectiviteit van de vaccins). In het geval dat men zowel vrouwtjes als mannetjes zou gebruiken, zouden deze zaken zorgen voor een grotere

spreiding van de uitkomsten van de experimenten, en om tot significante resultaten te komen, is het dan noodzakelijk om grotere hoeveelheden muizen per experiment te benutten. Om het aantal dieren beperkter te houden is er voor gekozen om alleen vrouwtjes in te zetten.

Per groep worden 30 (10 muizen per verdunning, 3 verdunningen) muizen gebruikt. Gestreefd wordt om per proef 6 vaccin batches tegelijk te testen zodat in verhouding minder referentie en controle muizen gebruikt worden ten opzichte van het aantal te testen batches. Bij 6 vaccin batches bestaat het aantal gebruikte muizen dan uit 30 x 3 serotypen voor het referentie vaccin, 6 x 30 x 3 voor de 6 te testen batches en 10 x 3 controle muizen voor de challenge. In totaal 660 muizen. Voor deze Pseudomonas potentie test aanvraag wordt de komende jaren uitgegaan van 60 vaccin batches verdeeld over 10 potentie testen op jaarbasis. Dit komt neer op maximaal 6600 muizen per jaar.

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 de challenge test uit te voeren in vitro. Vermindering: - De potentie test wordt altijd met meerdere batches tegelijkertijd ingezet. Doordat maar één referentie groep en één controle groep nodig voor meerdere vaccin batches levert dit een besparing oplevert in het aantal benodigde muizen. Vanuit de historie is gebleken dat Pseudomonas potentie testen met 1 referentie en 6 te testen vaccin batches een uitvoerbaar zijn zonder dat daarbij de kwaliteit van de uitgevoerde test in het geding komt. Verfijning: - Een humaan eindpunt wordt toegepast bij de muizen welke klinische verschijnselen tonen ten gevolge van de challenge met Pseudomonas aeruginosa. - Om het welzijn van de muizen te vergroten wordt kooiverrijking toegepast.

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

Muizen die verschijnselen vertonen ten gevolge van een infectie met Pseudomonas aeruginosa (lethargie en bol zitten, etc.) worden zo spoedig mogelijk geëuthanaseerd. Ook wanneer de muizen andere verschijnselen vertonen als beschreven in de Code Humane Eindpunten (zie onder J) worden de muizen direct geëuthanaseerd.

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.

Deze controles dienen volgens EU in EU lidstaat plaats te vinden, voor deze vaccinproducten vinden de controles bij ons instituut plaats, dit is vastgelegd in de productdossiers.

Accommodation and care

F. 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.

Een deel van de dieren uit de vaccinatiegroepen en de controledieren zullen een septicaemie ontwikkelen t.g.v. een infectie met *Pseudomonas aeruginosa*. Dit leidt in over het algemeen binnen 24-48 uur tot de dood en gaat gepaard met bol zitten, lethargie, ooguitvloeiing, niet eten, niet drinken, zware schokkende ademhaling. Uiteindelijk resulterend in zwaar ademen, niet meer op de omgeving reageren. De dieren worden geëuthanaseerd voordat dit stadium wordt bereikt. Dit houdt in dat dieren bij lethargie en bol zitten worden geëuthanaseerd. In verband met het

snelle verloop van de ziekte en het uitvoeren van euthanasie voordat ernstige verschijnselen optreden, wordt het niet zinvol geacht om pijnbestrijding toe te passen. Daarnaast beïnvloed pijnbestrijding de immuunrespons, hetgeen niet wenselijk wordt geacht gezien de aard van het experiment.

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?

* Op dag 0 worden de dieren gevaccineerd; dit geeft een gering ongerief. * Op dag 14, 15 of 16 vindt challenge plaats met een Pseudomonas aeruginosa concentratie; het injecteren geeft ongerief en een deel van de muizen uit de vaccinatiegroepen en de controledieren zullen een septicaemie ontwikkelen ten gevolge van een infectie met Pseudomonas aeruginosa. Dit leidt in over het algemeen binnen 24 uur tot de dood en gaat gepaard met bol zitten, lethargie, ooguitvloeiing, niet eten, niet drinken, zware schokkende ademhaling. * Euthanasie: gering ongerief.

Explain why these effects may emerge.

Het ontwikkelen van een septicaemie ten gevolge van de challenge met Pseudomonas aeruginosa.

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

Uitvoeren van humaan eindpunt bij muizen waarbij lethargie en bol zitten wordt waargenomen.

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.

Een humaan eind punt wordt toegepast bij de muizen welke klinische verschijnselen tonen ten gevolge van de challenge met *Pseudomonas aeruginosa*. Verschijnselen hiervan zijn bol zitten, lethargie, ooguitvloeiing, niet eten, niet drinken, zware schokkende ademhaling. Uiteindelijk resulterend in zwaar ademen, niet meer op de omgeving reageren. De muizen worden geëuthanaseerd voordat dit stadium wordt bereikt. Dit houdt in dat dieren bij lethargie en bol zitten worden geëuthanaseerd. Ook wanneer de muizen andere verschijnselen vertonen zoals beschreven in de door de diervoorzorging gehanteerde Code Human Eindpunten worden de dieren geëuthanaseerd. Uit de Code Humane Eindpunten: Klinische symptomen en voorwaarden waarop tot het toepassen van humane eindpunten dient te worden overgegaan. 1. Elke conditie die resulteert in een lange en onomkeerbare periode waarin het dier niet kan eten of drinken b.v. - langdurige immobiliteit - obstructie van de mondholte - geen gebit of slecht functionerend gebit 2. Ziekten of condities die aangeven dat er ernstig pijn, lijden en ongemak wordt ondergaan - fracturen - zelfverwonding - abnormale stemgeluiden - abnormale houding of beweging - open wonden of zweren 3. Snel of voortgaand gewichtsverlies b.v. 20% of meer gedurende een paar dagen of gradueel maar voortgaand gewichtsverlies 4 Minder verzorgingsgedrag (grooming) en abnormaal gedrag gedurende langere tijd b.v. ruw in de haren, haaruitval, langdurig diarree, verkleuring huid en haar door urineverlies, zwellingen aan de poten, verlamming of andere door CZS of perifere zenuwen veroorzaakte uitvalsverschijnselen (stuipen, draaibewegingen) 5 Ernstige of voortdurende respiratoire verschijnselen b.v. hoesten, niezen, neusuitvloeiing, bloed in neusschelp of bek. 6 Bloedingen, bloedarmoede of ongewone en ongebruikelijke uitvloeiingen 7 Aanwijzingen van microbiële infecties of andere ziekten, zeker als deze zullen interfereren met het experimentele protocol of worden veroorzaakt door bovengenoemde aandoeningen

Indicate the likely incidence.

De muizen in groep met de laagste verdunning van het vaccin (10E-1 of onverdund) zullen redelijk beschermd zijn tegen *Pseudomonas*. De serotypen van *Pseudomonas* verschillen in virulentie en de bescherming van het vaccin verschilt dan ook iets per serotype. In de laagste verdunning zal gemiddeld genomen geen van de muizen blootgesteld aan serotype 5 ziek worden, gemiddeld drie van de groep muizen blootgesteld aan serotype 6 en gemiddeld 1 van muis blootgesteld van serotype 7/8. De muizen in de volgende verdunning (10E-2 of 10E-0.8) zijn slechts gedeeltelijk beschermd zijn tegen *Pseudomonas*. Voor de serotypen 5, 6, 7/8 worden van de 10 muizen per groep respectievelijk 3, 5 en 4 ziek. En van de hoogste verdunning (10E-3 of 10E-1.6) zijn dat gemiddeld genomen 7 muizen voor alle serotypen. De muizen in de controle groep worden niet gevaccineerd en zullen niet beschermd zijn tegen *Pseudomonas*. Gemiddeld genomen worden 8 tot 9 van de muizen uit de controle groep ziek en krijgt een HEP of sterft. Overall komt gemiddeld genomen in een proefopzet met 6 te testen vaccin batches 82% (serotype 5), 56% (serotype 6) en 76% (serotype 7/8) in aanmerking voor HEP of is al voortijdig overleden.

K. Classification of severity of procedures

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

De muizen die voldoende beschermt zijn door het vaccin ondergaan een gering tot matig ongerief. Deze muizen zijn blootgesteld aan, hanteren, vaccinatie procedure en challenge. Daarentegen krijgen de muizen welke onvoldoende zijn beschermt tegen de infectie te maken met ernstig ongerief. Dit zijn de controle muizen (alleen challenge) maar ook de muizen welke gevaccineerd worden, recht evenredig met de verdunning van het vaccin. Over het geheel genomen ondervindt 59% van de muizen een gering ongerief (euthanasie aan het einde van de proef), 14% ondergaat een matig ongerief (HEP) en 27% ernstig ongerief (overlijdt in de proef).

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.

De overgebleven muizen zullen aan het einde van het experiment worden geëuthanaseerd. Met uitzondering van de controle groep zijn de muizen gevaccineerd en hebben alle muizen een challenge gehad met *Pseudomonas aeruginosa* en zijn daarom niet meer geschikt om in een andere proef gebruikt te 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.

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.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>3</td><td>Botulisme vaccin potentie test in muizen</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	3	Botulisme vaccin potentie test in muizen
Serial number	Type of animal procedure					
3	Botulisme vaccin potentie test in muizen					

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.

Het doel van de Botulisme vaccin potentie test is uitvoering van de wettelijk verplichte controle op de werkzaamheid/potentie van vaccinproducten voor *Clostridium botulinum* neurotoxine type C. De testopzet wordt uitgevoerd conform het bij de overheid gedeponeerde registratiedossier voor deze vaccins. De opzet is grotendeels overeenkomstig met de potentie test van *C. botulinum* vaccine voor veterinair gebruik zoals vastgelegd in het Europees farmacopee (EP 8.0 04/2013:0361). Voor iedere vaccin batch wordt hierbij werkzaamheid van het vaccin bepaald in de bescherming tegen botulisme neurotoxines. In het registratiedossier voor de Nederlandse markt wordt ieder vaccin in twee verdunningen getest: 1:8 en 1:32. Op dit moment is het registratiedossier onder behandeling voor de Europese markt. Deze zal pas in de loop van 2018 in werking treden. In de proefopzet voor de botulisme potentie test is daarbij een aanpassing gemaakt in de opzet waarbij alleen in de verdunning van 1:8 wordt getest. Hiermee wordt de proefopzet robuuster en geeft minder kans op ongerief door dat de verdunning welke de minste bescherming geeft niet wordt meegenomen.

Onderstaande beschrijving geeft zowel de huidige proefopzet van het Nederlandse registratiedossier als de toekomstige proefopzet volgens het Europees registratiedossier.

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

In deze procedure wordt gecontroleerd of de vaccin batch de vereiste bescherming geeft in een 1:8 en 1:32 verdunning (NL productdossier) of 1:8 verdunning (EU productdossier) waarbij de muizen worden blootgesteld aan botulisme neurotoxine type C in een dosis van 25 keer de 50% muis lethale dosis.

In de testopzet van het Nederlandse productdossier zijn per vaccin batch zijn de volgende groepen:

- Het te testen vaccin in een 1:8 verdunning (5 muizen)
- Het te testen vaccin in een 1:32 verdunning (5 muizen)

Daarnaast is er per uitgevoerde dierproef nog een controle groep:

- Een controlegroep (2 muizen), niet gevaccineerd om de werking van het toxine bij challenge aan te kunnen tonen.

In de testopzet van het Europese productdossier is per vaccin batch een testgroep:

- Het te testen vaccin in een 1:8 verdunning (10 muizen)

Daarnaast is er per uitgevoerde dierproef nog een controle groep:

- Een controlegroep (2 muizen), niet gevaccineerd om de werking van het toxine bij challenge aan te kunnen tonen.

Gestreefd wordt om per proef 6 vaccin batches tegelijk te testen, zodat minder controle muizen gebruikt worden. Op dag 0 worden de muizen in de vaccin groepen gevaccineerd met 0.2 ml verdunt vaccin, subcutaan in de nek. Op dag 21 worden alle groepen intraperitoneaal (ip) geïnoculeerd met 0,5 ml toxine per muis in een dosis van 25x LD50.

Vanaf de challenge worden de muizen gedurende 7 dagen tweemaal daags beoordeeld en het aantal geëuthanaseerde en dode muizen wordt geregistreerd. Ernstig zieke muizen met een botulismescore van 2 of 3 worden geëuthanaseerd. Zeven dagen na challenge worden de overlevende muizen geëuthanaseerd.

Bij de beoordeling worden de muizen gescoord volgens onderstaand schema:

0: Negatief, de muis is gezond

1: De muis heeft een iets versnelde ademhaling en een geringe insnoering van de taille.

2: De muis heeft kloppende flanken en een matige insnoering van de taille.

3: De muis heeft verlamingsverschijnselen, ademhalingsproblemen en een sterke insnoering van de taille (wespentaille).

+: De muis is dood.

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

Uitgangspunt voor de opzet van de Botulisme potentie test bij het productdossier voor toelating van de vaccins op de Nederlandse markt was de al decennia lopende Botulisme potentie test. De opzet hiervan is grotendeels overeenkomstig met de Botulisme vaccin potentie test zoals beschreven in het Europees farmacopee. Afwijkingen bestaan uit de toevoeging van de verdunning van 1:32 en een beperkter aantal muizen per groep: het Europees farmacopee schrijft 20 muizen per groep voor, in het product dossier worden 10 muizen per te testen vaccin gebruikt en 2 in de controle groep. De gebruikte opzet bespaard dus 10 muizen per te testen vaccin en 18 in de controle groep. Inmiddels is er een track record opgebouwd van de uitvoer op deze wijze welke laat zien dat de potentie test op deze manier voldoende betrouwbaar wordt uitgevoerd.

B. The animals

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

Muizen (*Mus musculus*) zijn zeer gevoelig voor het botulisme neurotoxine type C en daarom geschikt voor de vaccin potentie test voor botulinum neurotoxine type C. De gebruikte muizen zijn Oncins France 1 muizen (OF-1) of dieren van een andere, vergelijkbare, muizenstam.

Bij 6 vaccin batches bestaat het aantal gebruikte muizen dan uit 6 x 10 voor de 6 te testen batches en 2 controle muizen, in totaal 62 muizen. Bij de uitvoering van de potentie testen met 6 vaccins tegelijkertijd zijn 62 muizen nodig. De afgelopen jaren (vanaf 2012) zijn per jaar 17 tot 39 vaccin batches getest wat neer komt op 178 tot 404 muizen per jaar. Voor deze Botulisme vaccin potentie test aanvraag wordt de komende jaren uitgegaan van maximaal 60 vaccin batches verdeeld over 10 potentie testen. Dit komt neer op (10x62) 620 muizen per jaar.

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 immuunsysteem van de gevaccineerde dieren is essentieel voor het testen van de werking van vaccins. Het nabootsen van het immuunsysteem is niet mogelijk. Op dit moment is het testen alleen mogelijk met behulp van immuun competente dieren. Vermindering: - De opzet van de Botulisme vaccin potentie test is in essentie overeenkomstig met de potentie test zoals beschreven in de Europese farmacopee. De verschillen met het protocol in het EP zit in het gebruikte aantal dieren per vaccin: 20 in het EP versus 10 per vaccin en 2 voor de controle groep. Bij de uitvoering van een Botulisme vaccin potentie test met 6 vaccin batches levert dit een besparing op van 78 muizen. - De potentie test wordt met meerdere batches tegelijkertijd ingezet. Doordat maar één controle groep nodig is voor meerdere vaccin batches levert dit een besparing oplevert in het aantal benodigde muizen en ook voor het ongerief aangezien de controle groep normaal gesproken de enige groep is waarin ook botulisme verschijnselen optreden. Verfijning: - In de dossieraanvraag voor Europa is een aanpassing gemaakt in de opzet van de botulisme potentietest waarbij de 1:32 verdunning is vervangen door de 1:8 verdunning. hierdoor is de test robuuster (minder kans op herhaling) en minder kans op ongerief omdat de 1:32 verdunning, welke de minste bescherming geeft, niet wordt meegenomen. - Een humaan eind punt wordt toegepast bij de muizen welke klinische verschijnselen tonen ten gevolge van de challenge met botulisme neurotoxine. Verschijnselen hiervan zijn achtereenvolgens, versnelde ademhaling en geringe insnoering van de taille (score 1), kloppende flanken en matige insnoering van de taille (score 2) gevolgd door verlamingsverschijnselen, ademhalingsproblemen en een sterke insnoering van de taille (wespentaille)(score 3). De muizen worden

geëthanaseerd op het moment dat de klinische verschijnselen kloppende flanken en een matige insnoering van de taille zichtbaar (botulisme score 2). - Om het welzijn van de muizen te vergroten wordt kooiverrijking toegepast.

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

Muizen die botulisme verschijnselen vertonen gelijk aan een 2 of 3 score, worden zo spoedig mogelijk geëthanaseerd. Ook wanneer de muizen specifieke verschijnselen vertonen als in de door de dierverzorging gehanteerde Code Human Eindpunten worden de dieren geëthanaseerd.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

De Botulisme vaccin potentie test wordt uitgevoerd in het kader van de wettelijk verplichte controle op de werkzaamheid/potentie van vaccinproducten voor Clostridium botulinum type C. Dit is wettelijk verplicht voor vrijgave van vaccin batches op de Nederlandse en Europese markt. Deze controles dienen volgens EU in EU lidstaat plaats te vinden, voor deze vaccinproducten vinden de controles bij ons instituut plaats, dit is vastgelegd in de productdossiers.

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

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.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

- Op dag 0 worden de dieren gevaccineerd; dit geeft een gering ongerief. - Op dag 21 vindt challenge plaats met Botulisme neurotoxine type C. Botulinum toxines zijn neurotoxines welke aangrijpen op de overdracht tussen het zenuwuiteinde en de spier. De symptomen van botulisme bestaan uit algehele verlamningsverschijnselen en daarbij benauwdheid. De controle muizen zullen binnen 24 uur zeer ernstige botulisme verschijnselen

vertonen gevolgd door de dood of euthanasie (ernstig ongerief). De gevaccineerde muizen zijn in principe beschermt tegen het toxine en zullen geen botulisme verschijnselen ontwikkelen (gering ongerief). Van de muizen uit de vaccin groepen met de 1:8 verdunning is gemiddeld genomen 99.9% beschermd tegen het toxine. In de vaccin groep met de 1:32 verdunning is gemiddeld genomen 97.3% beschermd tegen het toxine. - Euthanasie: gering ongerief.

Explain why these effects may emerge.

Blootstelling aan botulinum toxine: Dit zijn neurotoxines welke aangrijpen op de overdracht tussen het zenuwuiteinde en de spier.

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

Uitvoeren van humaan eindpunt bij muizen waarbij Botulisme score 2 of 3 wordt waargenomen. Bij de beoordeling worden de muizen gescoord volgens onderstaand schema: 0: Negatief, de muis is gezond 1: De muis heeft een iets versnelde ademhaling en een geringe insnoering van de taille. 2: De muis heeft kloppende flanken en een matige insnoering van de taille. 3: De muis heeft verlamingsverschijnselen, ademhalingsproblemen en een sterke insnoering van de taille (wespentaille). +: De muis is dood.

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.

Muizen die ernstige botulisme verschijnselen vertonen gelijk aan een 2 of 3 score, worden zo spoedig mogelijk geëuthanaseerd. Ook wanneer de muizen aspecifieke verschijnselen vertonen als in de door de dierverzorging gehanteerde Code Human Eindpunten worden de dieren geëuthanaseerd. Uit de Code Humane Eindpunten: Klinische symptomen en voorwaarden waarop tot het toepassen van humane eindpunten dient te worden overgegaan. 1. Elke conditie die resulteert in een lange en onomkeerbare periode waarin het dier niet kan eten of drinken b.v. - langdurige immobiliteit - obstructie van de mondholte -

geen gebit of slecht functionerend gebit 2. Ziekten of condities die aangeven dat er ernstig pijn, lijden en ongemak wordt ondergaan - fracturen - zelfverwonding - abnormale stemgeluiden - abnormale houding of beweging - open wonden of zweren 3.

Snel of voortgaand gewichtsverlies b.v. 20% of meer gedurende een paar dagen of gradueel maar voortgaand gewichtsverlies 4 Minder verzorgingsgedrag (grooming) en abnormaal gedrag gedurende langere tijd b.v. ruw in de haren, haaruitval, langdurig diarree, verkleuring huid en haar door urineverlies, zwellingen aan de poten, verlamming of andere door CZS of perifere zenuwen veroorzaakte uitvalsverschijnselen (stuipen, draaibewegingen) 5 Ernstige of voortdurende respiratoire verschijnselen b.v. hoesten, niezen, neusuitvloeiing, bloed in neusschelp of bek. 6 Bloedingen, bloedarmoede of ongewone en ongebruikelijke uitvloeiingen 7 Aanwijzingen van microbiële infecties of andere ziekten, zeker als deze zullen interfereren met het experimentele protocol of worden veroorzaakt door bovengenoemde aandoeningen

Indicate the likely incidence.

De beide muizen in de controle groep komen in aanmerking voor HEP of zijn al voortijdig overleden. Gezien de bescherming van het vaccin zal slechts een zeer klein deel van de muizen in de vaccin groepen botulisme verschijnselen ontwikkelen. Gemiddeld genomen is dit 1,4% sinds de uitvoering van deze test voor het doeleinde van vaccincontrole, van het totaal aantal gevaccineerde muizen dat botulisme symptomen vertoont.

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).

Gering: De muizen in de vaccingroepen krijgen een injectie met vaccin en alle muizen krijgen een injectie met de toxine challenge (96.2%) Matig: een zeer beperkt aantal muizen ontwikkelt een eerst indicatie voor botulismeverschijnselen (score 1) en herstelt zich weer (minder dan 1%). Ernstig: bij de controlemuizen en in een beperkt aantal gevallen waarbij het vaccin onvoldoende bescherming biedt in de betreffende verdunning. Over de afgelopen haren was ernstig leed opgetreden bij alle controlemuizen (2.4% van het totaal) en bij enkele vaccin batches in de gevaccineerde groepen (gemiddeld over de jaren 1,4% van het totaal aantal muizen).

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.

De overgebleven muizen zullen aan het einde van het experiment worden geëthanaseerd. Aangezien de muizen gevaccineerd zijn met botulisme vaccin kunnen ze niet voor de botulisme diagnostiek of in een andere proef gebruikt 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.

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.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100					
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research					
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="638 861 1332 893">Serial number</th> <th data-bbox="1332 861 2038 893">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="638 893 1332 1045">1</td> <td data-bbox="1332 893 2038 1045">Mink Enteritis potentietest in Nertsen</td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Mink Enteritis potentietest in Nertsen	
Serial number	Type of animal procedure						
1	Mink Enteritis potentietest in Nertsen						

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.

Test wordt in nertsen (veel voorkomend doeldier) uitgevoerd zoals beschreven in geregistreerde productdossier volgens de geldende wettelijke normen, primaire uitkomstparameter is klinische verschijnselen van MEV infectie en uitscheiding van virus via faeces, welke door middel van virusisolatie en specifieke immuunkleuring wordt bevestigd.

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

Adaptatie:

d= -5 tot -3: Dieren worden opgehaald bij leverancier, gezondheidstoestand wordt bekeken en de dieren opgehoekt.

Deel 1: Vaccinatie

1.) d=1: Dieren van test groep worden subcutaan (losse huid in oksel) geïnoculeerd met 1 ml test materiaal.

2.) d=1 t/m 14: Alle dieren worden 14 dagen dagelijks geobserveerd. Eventuele observaties worden vastgelegd, mochten er ongewenste reacties ten gevolge van de vaccinatie hebben plaatsgevonden dan wordt de batch afgekeurd en zal tweede deel niet plaatsvinden. Indien geconstateerd wordt bij observatie dat dieren complicaties ondervinden op inspuitlek dan zullen deze dieren van nabij worden onderzocht om de inspuitlek te controleren.

In deze 14 dagen zal de immuunrespons vorm krijgen en immunologisch geheugen worden opgebouwd tegen het vaccin.

Deel 2: Potentie MEV

1.) d=15: 1 ml orale dosis Mink Enteritis Virus (MEV) wordt m.b.v. canule in slokdarm gebracht.

2.) d=16 t/m 18: 1 ml dosis MEV in voedsel

3.) d= 20 t/m 23: Faeces per dier worden op dagen 5, 6 en 7 na challenge verzameld. Hieruit zal virus worden geïsoleerd om te bewijzen dat infectie daadwerkelijk heeft plaatsgevonden in de controledieren en dat deze uitblijft in de gevaccineerde dieren. Te beginnen met gevaccineerde dieren en vervolgens de controle dieren. Per dier nieuwe spatel om faeces op te scheppen en handschoenen dienen tussentijds te worden gewisseld om kruisbesmettingen te voorkomen. Materiaal wordt bij -20oC opgeslagen.

4.) d=15 t/m 28: Dieren worden dagelijks geobserveerd, observaties worden vastgelegd. Algemeen beeld gedragingen van de nerts wordt gescoord, toestand van faeces wordt gescoord, eventuele opmerkingen over water- en voedselafname worden opgetekend.

Minimaal 80% (4/5) van de dieren van de ongevaccineerde controle groep dienen binnen 12 dagen na inoculatie symptomen van Mink Enteritis Virus infectie te vertonen. Indien dit niet plaatsvindt, moet de test als niet valide worden beschouwd (challenge is dan niet correct verlopen/sterk genoeg) en moet de complete test 1x worden herhaald.

5.) d=28: Dieren worden op dag 14 postchallenge (d=28) gesedeerd en vervolgens geëuthanaseerd,

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

Het streven is om een minimaal aantal van 4 parallele assays per testronde te halen om een schaalvoordeel en daarmee samenhangende reductie van benodigde dieren te bewerkstelligen. Maximale aantal is 8 parallele assays. Dit schaalvoordeel is dat er maar 5 negatieve controledieren nodig zijn voor de vrijgifte van 4 te controleren vaccinbatches. De opdrachtgever heeft vanuit dierwelzijns oogpunt toegezegd zoveel mogelijk te streven naar het laten parallel testen van zoveel mogelijk vaccine batches.

B. The animals

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

Herkomst

Mustela vison, SPF dieren (Vrij van MEV of immuunrespons tegen MEV) aangeleverd door Nederlandse Federatie van Edelpelsdierhouders. De Nederlandse federatie van Edelpelsdierhouders heeft bedrijven welke deze dieren met de gewenste status kunnen aanleveren. Er worden geen nertsen gefokt voor het doel als proefdier te dienen, het is daarom noodzakelijk om nertsen uit "praktijk" te betrekken. Hiertoe dient een art. 11 vrijstelling te worden aangevraagd bij de NVWA.\

Aantal

Voor het testen van 1 batch gebruiksklaar vaccin zijn de onderstaande dieren nodig:

5 dieren in test groep (gevaccineerd, met te testen vaccin)

5 dieren in controle groep (ongevaccineerd)

Bij meerdere batches zijn 5 dieren per vaccin batch nodig en blijft de controle groep gelijk. De testen zullen dan per voorkeur zodanig gepland worden dat er meerdere batches parallel worden getest, om zodoende te besparen op het aantal benodigde controle dieren.

In de periode van een jaar zullen naar schatting tussen de 30 en de 60 vaccinbatches in totaal getest moeten worden. Deze schatting van het aantal vaccinbatches kan lager uitvallen, kan echter ook ten gevolge van een meerproductie van vaccine om b.v. uitbraak te bestrijden, omhoog gaan. Het is daarnaast goed mogelijk dat door het groeiende aantal landen in Europa waar deze vaccins wordt toegepast het aantal batches in de toekomst zal gaan stijgen.

Het is gebleken, sinds 2009 tot nu, dat het nodig is om per 20 benodigde dieren 1 reservedier aan te schaffen. Het blijkt dat in de ergste gevallen in de adaptatieperiode tussen aankomst en de start van de experimenten ca. 5% van de dieren overlijdt. Uit sectie blijkt dat de redenen voor deze sterfte divers zijn, b.v. aangeboren afwijkingen, acute ziekte, etc.. Mink Enteritis Virus is een parvovirus. Dit is een familie van zeer besmettelijke en

resistente virussen. Het is vrijwel zeker dat de niet gevaccineerde reservedieren gedurende de challenge periode besmet worden. Dit maakt de dieren onbruikbaar voor de volgende vrijgifte testen.

Indien de schatting hierboven van het aantal batches wordt gehaald, dat wil zeggen 60 vaccin batches in totaal per jaar en de batches allemaal als enkele batch worden aangeboden om testen, betekent dit dat er $60 \text{ (vaccinbatches)} \times 10 \text{ (5 controle en 5 testgroep dieren)} + 60 \text{ reservedieren} = 660$ proefdieren per jaar nodig zijn om vaccin vrijgifte te bewerkstelligen. Voor de aangevraagde periode van 5 jaar zou dat $660 \times 5 = 3300$ dieren zijn.

Opm. i.v.m. met vraag door CCD: Op basis van de behoefte aan vaccin worden batches ter controle aangeboden door de fabrikant. De behoefte aan vaccin is evenredig aan het aantal te vaccineren dieren. Als het aantal dieren dat gevaccineerd moet worden daalt, zal de hoeveelheid te testen vaccines dalen en daarmee het aantal proefdieren dat hiervoor nodig is.

Leeftijd

De praktijk leert dat de meeste vaccins batches in najaar en winter geproduceerd en getest worden en dat de meeste dieren dan ook oud genoeg zijn om weinig tot geen klinische verschijnselen te vertonen (tussen de 4 en 8 maanden). In principe zullen er geen dieren jonger dan 4 maanden gebruikt worden. Echter is het vanwege uitbraken of productie-eisen soms nodig om eerder in het jaar te moeten testen, dan moet men noodgedwongen gebruik maken van jongere dieren.

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 door in vitro methoden is met de huidige stand van de wetenschap niet mogelijk, omdat de reactie van een levend wezen en in het bijzonder van het afweersysteem (immuunsysteem) op een vaccin, antiviraal middel of virus niet gesimuleerd kan worden. Vermindering: Het streven is om een minimaal aantal van 4 parallele assays per testronde te halen om een schaalvoordeel en daarmee samenhangende reductie van benodigde dieren te bewerkstelligen. Maximale aantal is 8 parallele assays. Dit schaalvoordeel is dat er maar 5 negatieve controledieren nodig zijn voor de vrijgifte van 4 of meer te controleren vaccinbatches. De opdrachtgever heeft vanuit dierwelzijns oogpunt toegezegd zoveel mogelijk te streven naar het laten parallel testen van zoveel mogelijk vaccine batches. Verfijning: Op dit moment is er geen verfijning mogelijk. Wel wordt er zorg voor gedragen, door procedures en training, dat er geen fouten worden gemaakt in de proefuitvoering, om zo goed mogelijk te voorkomen dat er geen proeven over gedaan moeten worden.

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

Biotechnische handelingen worden tot minimum beperkt. Sedatie wordt toegepast alvorens de dieren worden geëuthanaseerd. Proef vind plaats in BSL-2 dierverblijven, waarvan de uitgaande lucht HEPA M13 gefilterd wordt. Er is geen contact met de buitenwereld, en om deze reden is de kans op nadelige milieueffecten nihil.

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.

Deze controles dienen volgens EU in EU lidstaat plaats te vinden, voor deze vaccinproducten vinden de controles bij ons instituut plaats, dit is vastgelegd in de productdossiers, in principe kunnen andere partijen deze testen voor het beoogde doel van vaccin vrijgifte niet uitvoeren.

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?

F. Accommodation and care

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.

Analgesie en/of anesthesie wordt niet toegepast, omdat:

1.) Dit immuun status van dieren beïnvloed, hetgeen niet wenselijk is.

2.) Tevens zal anesthesie interfereren met de observatie van eventuele, ongewenste gedragingen van de dieren. 3.) Het ziekteverloop van de MEV infectie is bij de gebruikte oudere dieren mild (bij jonge dieren leidt MEV tot hoge sterfte, oudere dieren hebben een mild verloop) en daarom is pijnstilling niet nodig.

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?

* Alle biotechnische handelingen veroorzaken gering tot maximaal matig ongerief. Dit bestaat uit het vangen en fixeren van de dieren en het toedienen van vaccin d.m.v. injectie en toedienen van een orale dosis van MEV challenge materiaal. * MEV challenge leidt tot matig ongerief. Symptomen van ernstige MEV infectie zijn: anorexia, overgeven, faeces met witte/roze aanslag (slijm), diarree (roze of wit met slijm). Bij de volwassen dieren die in deze experimenten worden gebruikt en de toegepaste dosering van het virus zullen de klachten, naar verwachting, beperkt blijven tot de witte/roze faeces met slijm. * Gevaccineerde dieren ondervinden hoogstwaarschijnlijk geen enkel of zeer geringe ziekteverschijnselen, als de vaccins werken, daar de vaccins zeer effectief zijn gebleken door de jaren heen. Tot nu toe hebben nagenoeg geen van de gevaccineerde dieren symptomen getoond van MEV infectie, sporadisch komt een enkel dier voor met witte/roze faeces. * Euthanasie: Matig Ongerief.

Explain why these effects may emerge.

Biotechnische handelingen en besmetting met Mink Enteritis virus.

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

Aantal benodigde biotechnische handelingen wordt tot strikt noodzakelijk minimum beperkt. In veel gevallen zullen symptomen van de Mink Enteritis Virus infectie veelal mild of zelfs afwezig zijn, omdat in de gevaccineerde dieren de dieren beschermd worden (geen symptomen) en in de ongevaccineerde controle zal het ziekteverloop over het algemeen mild of afwezig zijn, omdat de dieren vaak oud genoeg zijn (4 maanden of ouder) om de nadelige effecten van de Mink Enteritis Virus infectie te weerstaan. Infectie en virusreproductie worden dan door middel van de virusisolatie uit de faeces vastgesteld.

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.

In incidentele gevallen wordt gezien dat ongevaccineerde, controle dieren anorexia vertonen (in 2010 en 2012, was dit in beide jaren 1 dier). Als ten gevolge van aanhoudende anorexia de dieren verzwakken zal eerst water en voer op een makkelijker te bereiken plaats worden aangeboden. Als dit gebeurd nemen de biotechnici van DB contact op met onderzoeker. Als dan anorexia nog aanhoudt en de dieren verder verzwakken dan zal worden overgegaan tot euthanasie (sedatie met dormitor en injectie intracardiaal van T61, volgens bijgevoegde werkvoorschrift). Dieren die ten gevolge van ziekte/anorexia die enige dagen aanhoudt, zodanig verzwakken dat ze niet meer zelfstandig kunnen eten zullen zo spoedig mogelijk worden afgemaakt. Aanhoudende anorexia is het weigeren van voedsel en water, waardoor er een verslechtering van de conditie en gezondheid van het dier veroorzaakt wordt. Enige dagen is in ieder geval meer dan 3. Het concretiseren van de humane eindpunten is moeilijker dan op eerste gezicht lijkt, om deze redenen is er voor gekozen om het niet hard te definiëren. Nertsen worden 1x per jaar in de vroege lente geboren, de testen worden gedurende het jaar op dieren van voortschrijdende leeftijd. Daarnaast ontvangen we outbred dieren van wisselende bloedlijnen (en daarmee samenhangende fenotypen) en kwaliteit. Hierdoor is de spreiding van de reactie op niet drinken/eten tussen groepen dieren en individuele dieren enorm. Het komt voor dat er dieren (b.v. slechte kwaliteit of jong of dunner type) zijn die na 2 dagen anorexia al in zodanig slechte conditie zijn, dat in samenspraak tussen DB en onderzoeker wordt besloten over te gaan tot euthanasie. Andere dieren (oudere dieren van betere kwaliteit) kunnen wel 7 dagen zonder eten, voordat ze problemen krijgen, en er zitten er zelfs bij die in de gewenningsperiode zo een dag of 3 a 4 niet eten uit eigen beweging, om dan vervolgens een dag goed te schransen en het verder goed doen in de proef. Als er hard gedefinieerd wordt: 4 dagen niet eten en drinken, dan laat dat geen ruimte voor interpretatie ter plaatse, dus duidelijk. Het gevaar hiervan is dat het geregeld voor gaat komen dat dieren of te laat of onnodig worden geëuthanaseerd. Om deze reden heeft het mijn sterke voorkeur om het per individueel dier te bekijken om onnodig leed en uitval te voorkomen.

Indicate the likely incidence.

Minder dan 0.5%.

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).

In ergste geval: matig. Bij de gevaccineerde dieren is er sprake van bescherming, het virus wordt geneutraliseerd door immuunsysteem. In de meeste negatieve controledier groepen (vaak oudere dieren) verloopt de besmetting nagenoeg asymptomatisch. Jonge dieren in de negatieve, ongevaccineerde controlegroep zullen nadelige gevolgen van challenge ondervinden, met name verlies van eetlust, lusteloosheid en bloederige diarree, de ernst van het ongerief kan dan oplopen tot ernstig. Matig: 99.5% Ernstig:

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.

De dieren zijn blootgesteld aan vaccin tegen Mink Enteritis Virus en het virus zelf, zijn hierdoor niet meer te gebruiken voor deze potentie test of andere immunologisch testen. Verder worden er geen andere experimentele handelingen uitgevoerd met deze diersoort.

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.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Pseudomonas vaccin potentietest in muizen</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Pseudomonas vaccin potentietest in muizen
Serial number	Type of animal procedure					
2	Pseudomonas vaccin potentietest in muizen					

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.

Het doel van de *Pseudomonas* vaccin potentie test is uitvoering van de wettelijk verplichte controle op de werkzaamheid/potentie van vaccinproducten voor *Pseudomonas aeruginosa* serotypen 5, 6 en 7/8. De testopzet wordt uitgevoerd conform de bij de overheid gedeponeerde productdossiers voor deze vaccins. De opzet van de potentie test is gebaseerd op de statistische methode van Reed en Muench voor bepaling van de 50% eindpunt bepaling (L.J. Reed, H. Muench. A simple method of estimating fifty percent end points. Am J Hyg, 27 (1938), pp. 493-497). Voor iedere vaccin batch wordt hierbij de relatieve potentie van het vaccin bepaald ten opzichte van een standaard referentie vaccin. Dit wordt bepaald voor elk van de drie verschillende *Pseudomonas aeruginosa* serotypen 5, 6 en 7/8 waartegen het vaccin bescherming biedt. De mate van bescherming van het te testen vaccin wordt berekend aan de hand van de methode van Reed en Muench en dient daarbij gelijk aan of beter te zijn dan het referentie vaccin.

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

In de procedure wordt de te testen vaccin batch vergeleken met een referentie vaccin. De proefopzet bevat daarmee de volgende proefgroepen per serotype:

- Het referentie vaccin, in de verdunningen 10E-1, 10E-2 en 10E-3 voor serotypen 5 en 6. Voor serotype 7/8 wordt een afwijkende verdunningsreeks gebruikt: onverdund, 10E-0.8 en 10E-1.6.
- Het te testen vaccin voor de serotypen 5 en 6 in de verdunningen 10E-1, 10E-2 en 10E-3. Voor serotype 7/8 wordt een afwijkende verdunningsreeks gebruikt: onverdund, 10E-0.8 en 10E-1.6.
- Controlegroep, niet gevaccineerd.

Op dag 0 worden de muizen in de groepen van het referentie vaccin en de te testen batches gevaccineerd met 0.2 ml verdunt vaccin, subcutaan in de nek.

Op dag 14, 15 of 16 worden alle groepen intraperitoneaal (i.p.) geïnoculeerd met één van de drie serotypen van *Pseudomonas aeruginosa* in een dosis van 10E6 - 10E7 colony forming units (CFU).

Vanaf de dag van challenge worden gedurende 3 dagen de muizen tweemaal daags beoordeeld en het aantal geëuthanaseerde en dode muizen wordt geregistreerd. Op dag 4 en 5 worden de muizen één maal per dag beoordeeld. Uit ervaring blijkt dat de ziekteverschijnselen alleen optreden in de eerste twee dagen na challenge.

Op dag 19, 20 of 21 (5 dagen na dag 14, 15 of 16) is de test afgerond en worden alle nog levende muizen geëuthanaseerd.

De resultaten worden verwerkt waarbij de toegediende challenge dosis wordt berekend aan de hand van een kiemtellingen. Voor een valide 50% eindpunt volgens Reed-Muench dient aan het einde van de test aan de onderstaande criteria te worden voldaan:

- Het referentie vaccin geeft meer dan ($>$) 50% bescherming in de laagste verdunning van het vaccin.
- Het referentie vaccin geeft minder dan ($<$) 50% bescherming in de hoogste verdunning van het vaccin.
- Het sterfte patroon van de verdunningen bij de referentie muizen en test muizen is lineair. Dat wil zeggen dat elke opeenvolgende verdunning van het vaccin een gelijk of groter aantal HEP/doden heeft dan de vorige verdunning.

De mate van bescherming van het te testen vaccin wordt vervolgens berekend aan de hand van de Reed-Muench 50% eindpunt bepaling.

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

Uitgangspunt voor de testprocedure voor toelating van de vaccins op de Nederlandse markt is in het verleden de test geweest zoals beschreven in de USDA-procedure voor toelating van de betreffende vaccins op de Amerikaanse markt. Hierin wordt een groter aantal dieren per groep gebruikt en een terug titratie van de challenge dosis uitgevoerd in muizen. Uit het oogpunt van terugdringen proefdiergebruik is voor toelating op de Nederlandse en Europese markt gekozen het aantal muizen per groep terug te brengen van 20 naar 10 en wordt ook de terug titratie *in vitro* uitgevoerd. Op deze wijze is de test opgenomen in de dossierregistratie.

Pseudomonas aeruginosa is een opportunistische kiem. Hierdoor is het verloop van het ziektebeeld minder voorspelbaar dan bijvoorbeeld bij *C. botulinum* toxine en zit er meer variatie in de respons. De testopzet en berekeningen zijn gebaseerd op de statistische Reed-Muench 50% eindpuntbepaling. Zoals boven beschreven moet voor een valide Reed-Muench eindpuntbepaling aan een aantal criteria worden voldaan. Bij kleinere aantallen dieren per groep zal de robuustheid van de test afnemen en het aantal testen toenemen waarbij de test niet meer voldoet aan de criteria voor de Reed-Meunch 50% eindpuntbepaling.

B. The animals

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

Muizen (*mus musculus*) zijn gevoelig voor de drie gebruikte *Pseudomonas aeruginosa* stammen en daarom geschikt voor de vaccin potentie test voor *Pseudomonas*. De gebruikte muizen zijn

Oncins France 1 muizen (OF-1) of dieren van een andere, vergelijkbare, muizenstam.

Pseudomonas is een opportunistische kiem waarbij de response minder voorspelbaar is dan bijvoorbeeld in de Botulisme potentie test, met meer variatie in de response. Voor dit type experiment worden vrouwelijke muizen gebruikt. De reden is dat mannelijke muizen een aantal kenmerken hebben die de resultaten van dit soort experimenten negatief beïnvloeden. Mannelijke muizen vertonen agressief gedrag en vechten met elkaar. Dit leidt o.a. tot stress (hetgeen leidt tot verhoogde cortisol niveaus die een nadelig effect hebben op het immuunsysteem, wat weer leidt tot lagere

effectiviteit van de vaccins). In het geval dat men zowel vrouwtjes als mannetjes zou gebruiken, zouden deze zaken zorgen voor een grotere spreiding van de uitkomsten van de experimenten, en om tot significante resultaten te komen, is het dan noodzakelijk om grotere hoeveelheden muizen per experiment te benutten. Om het aantal dieren beperkter te houden is er voor gekozen om alleen vrouwtjes in te zetten.

Per groep worden 30 (10 muizen per verdunning, 3 verdunningen) muizen gebruikt. Gestreefd wordt om per proef 6 vaccin batches tegelijk te testen zodat in verhouding minder referentie en controle muizen gebruikt worden ten opzichte van het aantal te testen batches. Bij 6 vaccin batches bestaat het aantal gebruikte muizen dan uit 30 x 3 serotypen voor het referentie vaccin, 6 x 30 x 3 voor de 6 te testen batches en 10 x 3 controle muizen voor de challenge. In totaal 660 muizen. Voor deze Pseudomonas potentie test aanvraag wordt de komende jaren uitgegaan van 60 vaccin batches verdeeld over 10 potentie testen op jaarbasis. Dit komt neer op maximaal 6600 muizen per jaar.

Opm. i.v.m. met vraag door CCD: Op basis van de behoefte aan vaccin worden batches ter controle aangeboden door de fabrikant. De behoefte aan vaccin is evenredig aan het aantal te vaccineren dieren. Als het aantal dieren dat gevaccineerd moet worden daalt, zal de hoeveelheid te testen vaccines dalen en daarmee het aantal proefdieren dat hiervoor nodig is.

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 de challenge test uit te voeren in vitro. Vermindering: - De potentie test wordt altijd met meerdere batches tegelijkertijd ingezet. Doordat maar één referentie groep en één controle groep nodig voor meerdere vaccin batches levert dit een besparing oplevert in het aantal benodigde muizen. Vanuit de historie is gebleken dat Pseudomonas potentie testen met 1 referentie en 6 te testen vaccin batches een uitvoerbaar zijn zonder dat daarbij de kwaliteit van de uitgevoerde test in het geding komt. Verfijning: - Een humaan eindpunt wordt toegepast bij de muizen welke klinische verschijnselen tonen ten gevolge van de challenge met Pseudomonas aeruginosa. - Om het welzijn van de muizen te vergroten wordt kooiverrijking toegepast.

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

Muizen die verschijnselen vertonen ten gevolge van een infectie met Pseudomonas aeruginosa (lethargie en bol zitten, etc.) worden zo spoedig mogelijk geëuthanaseerd. Ook wanneer de muizen andere verschijnselen vertonen als beschreven in de Code Humane Eindpunten (zie onder J) worden de muizen direct geëuthanaseerd.

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.

Deze controles dienen volgens EU in EU lidstaat plaats te vinden, voor deze vaccinproducten vinden de controles bij ons instituut plaats, dit is vastgelegd in de productdossiers.

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.

Een deel van de dieren uit de vaccinatiegroepen en de controledieren zullen een septicaemie ontwikkelen t.g.v. een infectie met *Pseudomonas aeruginosa*. Dit leidt in over het algemeen binnen 24-48 uur tot de dood en gaat gepaard met bol zitten, lethargie, ooguitvloeiing, niet eten, niet drinken, zware schokkende ademhaling. Uiteindelijk resulterend in zwaar ademen, niet meer op de omgeving reageren. De dieren worden geëuthanaseerd voordat dit stadium wordt bereikt. Dit houdt in dat dieren bij lethargie en bol zitten worden geëuthanaseerd. In verband met het snelle verloop van de ziekte en het uitvoeren van euthanasie voordat ernstige verschijnselen optreden, wordt het niet zinvol geacht om pijnbestrijding toe te passen. Daarnaast beïnvloed pijnbestrijding de immunrespons, hetgeen niet wenselijk wordt geacht gezien de aard van het experiment.

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?

* Op dag 0 worden de dieren gevaccineerd; dit geeft een gering ongerief. * Op dag 14, 15 of 16 vindt challenge plaats met een *Pseudomonas aeruginosa* concentratie; het injecteren geeft ongerief en een deel van de muizen uit de vaccinatiegroepen en de controledieren zullen een septicaemie ontwikkelen ten gevolge van een infectie met *Pseudomonas aeruginosa*. Dit leidt in over het algemeen binnen 24 uur tot de dood en gaat gepaard met bol zitten, lethargie, ooguitvloeiing, niet eten, niet drinken, zware schokkende ademhaling. * Euthanasie: gering ongerief.

Explain why these effects may emerge.

Het ontwikkelen van een septicaemie ten gevolge van de challenge met *Pseudomonas aeruginosa*.

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

Uitvoeren van humaan eindpunt bij muizen waarbij lethargie en bol zitten wordt waargenomen.

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.

Een humaan eind punt wordt toegepast bij de muizen welke klinische verschijnselen tonen ten gevolge van de challenge met *Pseudomonas aeruginosa*. Verschijnselen hiervan zijn bol zitten, lethargie, ooguitvloeiing, niet eten, niet drinken, zware schokkende ademhaling. Uiteindelijk resulterend in zwaar ademen, niet meer op de omgeving reageren. De muizen worden geëuthanaseerd voordat dit stadium wordt bereikt. Dit houdt in dat dieren bij lethargie en bol zitten worden geëuthanaseerd. Ook wanneer de muizen andere verschijnselen vertonen zoals beschreven in de door de diervoorzorging gehanteerde Code Human Eindpunten worden de dieren geëuthanaseerd. Uit de Code Humane Eindpunten: Klinische symptomen en voorwaarden waarop tot het toepassen van humane eindpunten dient te worden overgegaan. 1. Elke conditie die resulteert in een lange en onomkeerbare periode waarin het dier niet kan eten of drinken b.v. - langdurige immobiliteit - obstructie van de mondholte - geen gebit of slecht functionerend gebit 2. Ziekten of condities die aangeven dat er ernstig pijn, lijden en ongemak wordt ondergaan - fracturen - zelfverwonding - abnormale stemgeluiden - abnormale houding of beweging - open wonden of zweren 3.

Snel of voortgaand gewichtsverlies b.v. 20% of meer gedurende een paar dagen of gradueel maar voortgaand gewichtsverlies 4 Minder verzorgingsgedrag (grooming) en abnormaal gedrag gedurende langere tijd b.v. ruw in de haren, haaruitval, langdurig diarree, verkleuring huid en haar door urineverlies, zwellingen aan de poten, verlamming of andere door CZS of perifere zenuwen veroorzaakte uitvalsverschijnselen (stuipen, draaibewegingen) 5 Ernstige of voortdurende respiratoire verschijnselen b.v. hoesten, niezen, neusuitvloeiing, bloed in neusschelp of bek. 6 Bloedingen, bloedarmoede of ongewone en ongebruikelijke uitvloeiingen 7 Aanwijzingen van microbiële infecties of andere ziekten, zeker als deze zullen interfereren met het experimentele protocol of worden veroorzaakt door bovengenoemde aandoeningen

Indicate the likely incidence.

De muizen in groep met de laagste verdunning van het vaccin (10E-1 of onverdund) zullen redelijk beschermd zijn tegen *Pseudomonas*. De serotypen van *Pseudomonas* verschillen in virulentie en de bescherming van het vaccin verschilt dan ook iets per serotype. In de laagste verdunning zal gemiddeld genomen geen van de muizen blootgesteld aan serotype 5 ziek worden, gemiddeld drie van de groep muizen blootgesteld aan serotype 6 en gemiddeld 1 van muis blootgesteld van serotype 7/8. De muizen in de volgende verdunning (10E-2 of 10E-0.8) zijn slechts gedeeltelijk beschermd zijn tegen *Pseudomonas*. Voor de serotypen 5, 6, 7/8 worden van de 10 muizen per groep respectievelijk 3, 5 en 4 ziek. En van de hoogste verdunning (10E-3 of 10E-1.6) zijn dat gemiddeld genomen 7 muizen voor alle serotypen. De muizen in de controle groep worden niet gevaccineerd en zullen niet beschermd zijn tegen *Pseudomonas*. Gemiddeld genomen worden 8 tot 9 van de muizen uit de controle groep ziek en krijgt een HEP of sterft. Overall komt gemiddeld genomen in een proefopzet met 6 te testen vaccin batches 82% (serotype 5), 56% (serotype 6) en 76% (serotype 7/8) in aanmerking voor HEP of is al voortijdig overleden.

K. Classification of severity of procedures

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

De muizen die voldoende beschermt zijn door het vaccin ondergaan een gering tot matig ongerief. Deze muizen zijn blootgesteld aan, hanteren, vaccinatie procedure en challenge. Daarentegen krijgen de muizen welke onvoldoende zijn beschermt tegen de infectie te maken met ernstig ongerief. Dit zijn de controle muizen (alleen challenge) maar ook de muizen welke gevaccineerd worden, recht evenredig met de verdunning van het vaccin. Over het geheel genomen ondervindt 59% van de muizen een gering ongerief (euthanasie aan het einde van de proef), 14% ondergaat een matig ongerief (HEP) en 27% ernstig ongerief (overlijdt in de proef).

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.

De overgebleven muizen zullen aan het einde van het experiment worden geëuthanaseerd. Met uitzondering van de controle groep zijn de muizen gevaccineerd en hebben alle muizen een challenge gehad met *Pseudomonas aeruginosa* en zijn daarom niet meer geschikt om in een andere proef gebruikt te 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.

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.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 3	Type of animal procedure Botulisme vaccin potentie test in muizen

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.

Het doel van de Botulisme vaccin potentie test is uitvoering van de wettelijk verplichte controle op de werkzaamheid/potentie van vaccinproducten voor *Clostridium botulinum* neurotoxine type C. De testopzet wordt uitgevoerd conform het bij de overheid gedeponeerde registratiedossier voor deze vaccins. De opzet is grotendeels overeenkomstig met de potentie test van *C. botulinum* vaccine voor veterinaire gebruik zoals vastgelegd in het Europees farmacopee (EP 8.0 04/2013:0361). Voor iedere vaccin batch wordt hierbij werkzaamheid van het vaccin bepaald in de bescherming tegen botulisme neurotoxines. In het registratiedossier voor de Nederlandse markt wordt ieder vaccin in twee verdunningen getest: 1:8 en 1:32. Op dit moment is het registratiedossier onder behandeling voor de Europese markt. Deze zal pas in de loop van 2018 in werking treden. In de proefopzet voor de botulisme potentie test is daarbij een aanpassing gemaakt in de opzet waarbij alleen in de verdunning van 1:8 wordt getest. Hiermee wordt de proefopzet robuuster en geeft minder kans op ongerief door dat de verdunning welke de minste bescherming geeft niet wordt meegenomen.

Onderstaande beschrijving geeft zowel de huidige proefopzet van het Nederlandse registratiedossier als de toekomstige proefopzet volgens het Europees registratiedossier.

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

In deze procedure wordt gecontroleerd of de vaccin batch de vereiste bescherming geeft in een 1:8 en 1:32 verdunning (NL productdossier) of 1:8 verdunning (EU productdossier) waarbij de muizen worden blootgesteld aan botulisme neurotoxine type C in een dosis van 25 keer de 50% muis lethale dosis.

In de testopzet van het Nederlandse productdossier zijn per vaccin batch zijn de volgende groepen:

- Het te testen vaccin in een 1:8 verdunning (5 muizen)
- Het te testen vaccin in een 1:32 verdunning (5 muizen)

Daarnaast is er per uitgevoerde dierproef nog een controle groep:

- Een controlegroep (2 muizen), niet gevaccineerd om de werking van het toxine bij challenge aan te kunnen tonen.

In de testopzet van het Europese productdossier is per vaccin batch een testgroep:

- Het te testen vaccin in een 1:8 verdunning (10 muizen)

Daarnaast is er per uitgevoerde dierproef nog een controle groep:

- Een controlegroep (2 muizen), niet gevaccineerd om de werking van het toxine bij challenge aan te kunnen tonen.

Gestreefd wordt om per proef 6 vaccin batches tegelijk te testen, zodat minder controle muizen gebruikt worden. Op dag 0 worden de muizen in de vaccin groepen gevaccineerd met 0.2 ml verdunt vaccin, subcutaan in de nek. Op dag 21 worden alle groepen intraperitoneaal (ip) geïnoculeerd met 0,5 ml toxine per muis in een dosis van 25x LD50.

Vanaf de challenge worden de muizen gedurende 7 dagen tweemaal daags beoordeeld en het aantal geëuthanaseerde en dode muizen wordt geregistreerd. Ernstig zieke muizen met een botulismescore van 2 of 3 worden geëuthanaseerd. Zeven dagen na challenge worden de overlevende muizen geëuthanaseerd.

Bij de beoordeling worden de muizen gescoord volgens onderstaand schema:

0: Negatief, de muis is gezond

1: De muis heeft een iets versnelde ademhaling en een geringe insnoering van de taille.

2: De muis heeft kloppende flanken en een matige insnoering van de taille.

3: De muis heeft verlamingsverschijnselen, ademhalingsproblemen en een sterke insnoering van de taille (wespentaille).

+: De muis is dood.

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

Uitgangspunt voor de opzet van de Botulisme potentie test bij het productdossier voor toelating van de vaccins op de Nederlandse markt was de al decennia lopende Botulisme potentie test. De opzet hiervan is grotendeels overeenkomstig met de Botulisme vaccin potentie test zoals beschreven in het Europees farmacopee. Afwijkingen bestaan uit de toevoeging van de verdunning van 1:32 en een beperkter aantal muizen per groep: het Europees farmacopee schrijft 20 muizen per groep voor, in het product dossier worden 10 muizen per te testen vaccin gebruikt en 2 in de controle groep. De gebruikte opzet bespaard dus 10 muizen per te testen vaccin en 18 in de controle groep. Inmiddels is er een track record opgebouwd van de uitvoer op deze wijze welke laat zien dat de potentie test op deze manier voldoende betrouwbaar wordt uitgevoerd.

B. The animals

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

Muizen (*Mus musculus*) zijn zeer gevoelig voor het botulisme neurotoxine type C en daarom geschikt voor de vaccin potentie test voor botulinum neurotoxine type C. De gebruikte muizen zijn Oncins France 1 muizen (OF-1) of dieren van een andere, vergelijkbare, muizenstam.

Bij 6 vaccin batches bestaat het aantal gebruikte muizen dan uit 6 x 10 voor de 6 te testen batches en 2 controle muizen, in totaal 62 muizen. Bij de uitvoering van de potentie testen met 6 vaccins tegelijkertijd zijn 62 muizen nodig. De afgelopen jaren (vanaf 2012) zijn per jaar 17 tot 39 vaccin batches getest wat neer komt op 178 tot 404 muizen per jaar. Voor deze Botulisme vaccin potentie test aanvraag wordt de komende jaren uitgegaan van maximaal 60 vaccin batches verdeeld over 10 potentie testen. Dit komt neer op (10x62) 620 muizen per jaar.

Opm. i.v.m. met vraag door CCD: Op basis van de behoefte aan vaccin worden batches ter controle aangeboden door de fabrikant. De behoefte aan vaccin is evenredig aan het aantal te vaccineren dieren. Als het aantal dieren dat gevaccineerd moet worden daalt, zal de hoeveelheid te testen vaccines dalen en daarmee het aantal proefdieren dat hiervoor nodig is.

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: -Er is geen alternatieve test beschikbaar die de mate van bescherming weergeeft voor het botulisme vaccin. Daarmee is het niet mogelijk om de challenge test uit te voeren in vitro. Daarnaast is het wettelijk verplicht om controle op de werkzaamheid/potentie van vaccinproducten voor *Clostridium botulinum* neurotoxine type C uit te voeren en is de potentie test conform het bij de overheid gedeponeerde registratiedossier voor deze vaccins. Vermindering: - De opzet van de Botulisme vaccin potentie test is in essentie overeenkomstig met de potentie test zoals beschreven in de Europese farmacopee. De verschillen met het protocol in het EP zit in het gebruikte aantal dieren per vaccin: 20 in het EP versus 10 per vaccin en 2 voor de controle groep. Bij de uitvoering van een Botulisme vaccin potentie test met 6 vaccin batches levert dit een besparing op van 78 muizen. -De potentie test wordt met meerdere batches tegelijkertijd ingezet. Doordat maar één controle groep nodig is voor meerdere vaccin batches levert dit een besparing oplevert in het aantal benodigde muizen en ook voor het ongerief aangezien de controle groep

normaal gesproken de enige groep is waarin ook botulisme verschijnselen optreden. Verfijning: - In de dossieraanvraag voor Europa is een aanpassing gemaakt in de opzet van de botulisme potentietest waarbij de 1:32 verdunning is vervangen door de 1:8 verdunning. Hierdoor is de test robuuster (minder kans op herhaling) en minder kans op ongerief omdat de 1:32 verdunning, welke de minste bescherming geeft, niet wordt meegenomen. - Een humaan eind punt wordt toegepast bij de muizen welke klinische verschijnselen tonen ten gevolge van de challenge met botulisme neurotoxine. Verschijnselen hiervan zijn achtereenvolgens, versnelde ademhaling en geringe insnoering van de taille (score 1), kloppende flanken en matige insnoering van de taille (score 2) gevolgd door verlamingsverschijnselen, ademhalingsproblemen en een sterke insnoering van de taille (wespentaille)(score 3). De muizen worden geëuthanaseerd op het moment dat de klinische verschijnselen kloppende flanken en een matige insnoering van de taille zichtbaar (botulisme score 2). - Om het welzijn van de muizen te vergroten wordt kooiverrijking toegepast.

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

Muizen die botulisme verschijnselen vertonen gelijk aan een 2 of 3 score, worden zo spoedig mogelijk geëuthanaseerd. Ook wanneer de muizen specifieke verschijnselen vertonen als in de door de diervoorzorging gehanteerde Code Human Eindpunten worden de dieren geëuthanaseerd.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

De Botulisme vaccin potentie test wordt uitgevoerd in het kader van de wettelijk verplichte controle op de werkzaamheid/potentie van vaccinproducten voor *Clostridium botulinum* type C. Dit is wettelijk verplicht voor vrijgave van vaccin batches op de Nederlandse en Europese markt. Deze controles dienen volgens EU in EU lidstaat plaats te vinden, voor deze vaccinproducten vinden de controles bij ons instituut plaats, dit is vastgelegd in de productdossiers.

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.

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.

Botulisme toxines zijn neurotoxines welke aangrijpen op de overdracht tussen het zenuwuiteinde en de spier. De symptomen van botulisme bestaan uit algehele verlamingsverschijnselen en daarbij benauwdheid. Omdat er in het experiment gewerkt wordt met het zuivere toxine is er geen reden om aan te nemen dat dit direct gepaard gaat met pijn. Het toxine zelf wordt in de medische wereld in een aantal gevallen ook ingezet voor bestrijding van chronische pijn. Bij het waarnemen van botulisme verschijnselen worden de dieren direct geëuthanaseerd en is er geen noodzaak tot pijnbestrijding.

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?

- Op dag 0 worden de dieren gevaccineerd; dit geeft een gering ongerief. - Op dag 21 vindt challenge plaats met Botulisme neurotoxine type C. Botulinum toxines zijn neurotoxines welke aangrijpen op de overdracht tussen het zenuwuiteinde en de spier. De symptomen van botulisme bestaan uit algehele verlamingsverschijnselen en daarbij benauwdheid. De controle muizen zullen binnen 24 uur zeer ernstige botulisme verschijnselen vertonen gevolgd door de dood of euthanasie (ernstig ongerief). De gevaccineerde muizen zijn in principe beschermt tegen het toxine en zullen geen botulisme verschijnselen ontwikkelen (gering ongerief). Van de muizen uit de vaccin groepen met de 1:8 verdunning is gemiddeld genomen 99.9% beschermd tegen het toxine. In de vaccin groep met de 1:32 verdunning is gemiddeld genomen 97.3% beschermd tegen het toxine. - Euthanasie: gering ongerief.

Explain why these effects may emerge.

Blootstelling aan botulinum toxine: Dit zijn neurotoxines welke aangrijpen op de overdracht tussen het zenuwuiteinde en de spier.

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

Uitvoeren van humaan eindpunt bij muizen waarbij Botulisme score 2 of 3 wordt waargenomen. Bij de beoordeling worden de muizen gescoord volgens onderstaand schema: 0: Negatief, de muis is gezond 1: De muis heeft een iets versnelde ademhaling en een geringe insnoering van de taille. 2: De muis heeft kloppende flanken en een matige insnoering van de taille. 3: De muis heeft verlamingsverschijnselen, ademhalingsproblemen en een sterke insnoering van de taille (wespentaille). +: De muis is dood.

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.

Muizen die ernstige botulisme verschijnselen vertonen gelijk aan een 2 of 3 score, worden zo spoedig mogelijk geëuthanaseerd. Ook wanneer de muizen specifieke verschijnselen vertonen als in de door de diervoorzorging gehanteerde Code Human Eindpunten worden de dieren geëuthanaseerd. Uit de Code Humane Eindpunten: Klinische symptomen en voorwaarden waarop tot het toepassen van humane eindpunten dient te worden overgegaan. 1. Elke conditie die resulteert in een lange en onomkeerbare periode waarin het dier niet kan eten of drinken b.v. - langdurige immobiliteit - obstructie van de mondholte -

geen gebit of slecht functionerend gebit 2. Ziekten of condities die aangeven dat er ernstig pijn, lijden en ongemak wordt ondergaan - fracturen - zelfverwonding - abnormale stemgeluiden - abnormale houding of beweging - open wonden of zweren 3.

Snel of voortgaand gewichtsverlies b.v. 20% of meer gedurende een paar dagen of gradueel maar voortgaand gewichtsverlies 4 Minder verzorgingsgedrag (grooming) en abnormaal gedrag gedurende langere tijd b.v. ruw in de haren, haaruitval, langdurig diarree, verkleuring huid en haar door urineverlies, zwellingen aan de poten, verlamming of andere door CZS of perifere zenuwen veroorzaakte uitvalsverschijnselen (stuipen, draaibewegingen) 5 Ernstige of voortdurende respiratoire verschijnselen b.v. hoesten, niezen, neusuitvloeiing, bloed in neusschelp of bek. 6 Bloedingen, bloedarmoede of ongewone en ongebruikelijke uitvloeiingen 7 Aanwijzingen van microbiële infecties of andere ziekten, zeker als deze zullen interfereren met het experimentele protocol of worden veroorzaakt door bovengenoemde aandoeningen

Indicate the likely incidence.

De beide muizen in de controle groep komen in aanmerking voor HEP of zijn al voortijdig overleden. Gezien de bescherming van het vaccin zal slechts een zeer klein deel van de muizen in de vaccin groepen botulisme verschijnselen ontwikkelen. Gemiddeld genomen is dit 1,4% sinds de uitvoering van deze test voor het doeleinde van vaccincontrole, van het totaal aantal gevaccineerde muizen dat botulisme symptomen vertoont.

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).

Gering: De muizen in de vaccingroepen krijgen een injectie met vaccin en alle muizen krijgen een injectie met de toxine challenge (96.2%) Matig: een zeer beperkt aantal muizen ontwikkelt een eerst indicatie voor botulismeverwijnselen (score 1) en herstelt zich weer (minder dan 1%). Ernstig: bij de controlemuizen en in een beperkt aantal gevallen waarbij het vaccin onvoldoende bescherming biedt in de betreffende verdunning. Over de afgelopen haren was ernstig leed opgetreden bij alle controlemuizen (2.4% van het totaal) en bij enkele vaccin batches in de gevaccineerde groepen (gemiddeld over de jaren 1,4% van het totaal aantal muizen).

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.

De overgebleven muizen zullen aan het einde van het experiment worden geëthanaseerd. Aangezien de muizen gevaccineerd zijn met botulisme vaccin kunnen ze niet voor de botulisme diagnostiek of in een andere proef gebruikt 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.

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.
- 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 2	Type of animal procedure Pseudomonas vaccin potentietest in muizen

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.

Het doel van de *Pseudomonas* vaccin potentie test is uitvoering van de wettelijk verplichte controle op de werkzaamheid/potentie van vaccinproducten voor *Pseudomonas aeruginosa* serotypen 5, 6 en 7/8. De testopzet wordt uitgevoerd conform de bij de overheid gedeponeerde productdossiers voor deze vaccins. De opzet van de potentie test is gebaseerd op de statistische methode van Reed en Muench voor bepaling van de 50% eindpunt bepaling (L.J. Reed, H. Muench. A simple method of estimating fifty percent end points. Am J Hyg, 27 (1938), pp. 493-497). Voor iedere vaccin batch wordt hierbij de relatieve potentie van het vaccin bepaald ten opzichte van een standaard referentie vaccin. Dit wordt bepaald voor elk van de drie verschillende *Pseudomonas aeruginosa* serotypen 5, 6 en 7/8 waartegen het vaccin bescherming biedt. De mate van bescherming van het te testen vaccin wordt berekend aan de hand van de methode van Reed en Muench en dient daarbij gelijk aan of beter te zijn dan het referentie vaccin.

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

In de procedure wordt de te testen vaccin batch vergeleken met een referentie vaccin. De proefopzet bevat daarmee de volgende proefgroepen per serotype:

- Het referentie vaccin, in de verdunningen 10E-1, 10E-2 en 10E-3 voor serotypen 5 en 6. Voor serotype 7/8 wordt een afwijkende verdunningsreeks gebruikt: onverdund, 10E-0.8 en 10E-1.6.
- Het te testen vaccin voor de serotypen 5 en 6 in de verdunningen 10E-1, 10E-2 en 10E-3. Voor serotype 7/8 wordt een afwijkende verdunningsreeks gebruikt: onverdund, 10E-0.8 en 10E-1.6.
- Controlegroep, niet gevaccineerd.

Op dag 0 worden de muizen in de groepen van het referentie vaccin en de te testen batches gevaccineerd met 0.2 ml verdunt vaccin, subcutaan in de nek.

Op dag 14, 15 of 16 worden alle groepen intraperitoneaal (i.p.) geïnoculeerd met één van de drie serotypen van *Pseudomonas aeruginosa* in een dosis van 10E6 - 10E7 colony forming units (CFU).

Vanaf de dag van challenge worden gedurende 3 dagen de muizen tweemaal daags beoordeeld en het aantal geëuthanaseerde en dode muizen wordt geregistreerd. Op dag 4 en 5 worden de muizen één maal per dag beoordeeld. Uit ervaring blijkt dat de ziekteverschijnselen alleen optreden in de eerste twee dagen na challenge.

Op dag 19, 20 of 21 (5 dagen na dag 14, 15 of 16) is de test afgerond en worden alle nog levende muizen geëuthanaseerd.

De resultaten worden verwerkt waarbij de toegediende challenge dosis wordt berekend aan de hand van een kiemtellingen. Voor een valide 50% eindpunt volgens Reed-Muench dient aan het einde van de test aan de onderstaande criteria te worden voldaan:

- Het referentie vaccin geeft meer dan (>) 50% bescherming in de laagste verdunning van het vaccin.
- Het referentie vaccin geeft minder dan (<) 50% bescherming in de hoogste verdunning van het vaccin.
- Het sterfte patroon van de verdunningen bij de referentie muizen en test muizen is lineair. Dat wil zeggen dat elke opeenvolgende verdunning van het vaccin een gelijk of groter aantal HEP/doden heeft dan de vorige verdunning.

De mate van bescherming van het te testen vaccin wordt vervolgens berekend aan de hand van de Reed-Muench 50% eindpunt bepaling.

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

Uitgangspunt voor de testprocedure voor toelating van de vaccins op de Nederlandse markt is in het verleden de test geweest zoals beschreven in de USDA-procedure voor toelating van de betreffende vaccins op de Amerikaanse markt. Hierin wordt een groter aantal dieren per groep gebruikt en een terug titratie van de challenge dosis uitgevoerd in muizen. Uit het oogpunt van terugdringen proefdiergebruik is voor toelating op de Nederlandse en Europese markt gekozen het aantal muizen per groep terug te brengen van 20 naar 10 en wordt ook de terug titratie *in vitro* uitgevoerd. Op deze wijze is de test opgenomen in de dossierregistratie.

Pseudomonas aeruginosa is een opportunistische kiem. Hierdoor is het verloop van het ziektebeeld minder voorspelbaar dan bijvoorbeeld bij *C. botulinum* toxine en zit er meer variatie in de respons. De testopzet en berekeningen zijn gebaseerd op de statistische Reed-Muench 50% eindpuntbepaling. Zoals boven beschreven moet voor een valide Reed-Muench eindpuntbepaling aan een aantal criteria worden voldaan. Bij kleinere aantallen dieren per groep zal de robuustheid van de test afnemen en het aantal testen toenemen waarbij de test niet meer voldoet aan de criteria voor de Reed-Meunch 50% eindpuntbepaling.

B. The animals

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

Muizen (*mus musculus*) zijn gevoelig voor de drie gebruikte *Pseudomonas aeruginosa* stammen en daarom geschikt voor de vaccin potentie test voor *Pseudomonas*. De gebruikte muizen zijn Oncins France 1 muizen (OF-1) of dieren van een andere, vergelijkbare, muizenstam. Per groep worden 30 (10 muizen per verdunning, 3 verdunningen) muizen gebruikt. Gestreefd wordt om per proef 6 vaccin batches tegelijk te testen zodat in verhouding minder referentie en controle muizen gebruikt worden ten opzichte van het aantal te testen batches. Bij 6 vaccin batches bestaat het aantal gebruikte muizen dan uit 30 x 3 serotypen voor het referentie vaccin, 6 x 30 x 3 voor de 6 te testen batches en 10 x 3 controle muizen voor de challenge. In totaal 660 muizen. Voor deze *Pseudomonas* potentie test aanvraag wordt de komende jaren uitgegaan van 60 vaccin batches verdeeld over 10 potentie testen op jaarbasis. Dit komt neer op maximaal 6600 muizen per jaar.

Species
Mus musculus

Origin
Matig

Maximum number of animals
33000

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 de challenge test uit te voeren in vitro. Vermindering: - De potentie test wordt altijd met meerdere batches tegelijkertijd ingezet. Doordat maar één referentie groep en één controle groep nodig voor meerdere vaccin batches levert dit een besparing oplevert in het aantal benodigde muizen. Vanuit de historie is gebleken dat Pseudomonas potentie testen met 1 referentie en 6 te testen vaccin batches een uitvoerbaar zijn zonder dat daarbij de kwaliteit van de uitgevoerde test in het geding komt. Verfijning: - Een humaan eindpunt wordt toegepast bij de muizen welke klinische verschijnselen tonen ten gevolge van de challenge met Pseudomonas aeruginosa. - Om het welzijn van de muizen te vergroten wordt kooiverrijking toegepast.

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

Muizen die verschijnselen vertonen ten gevolge van een infectie met *Pseudomonas aeruginosa* (lethargie en bol zitten, etc.) worden zo spoedig mogelijk geëuthanaseerd. Ook wanneer de muizen andere verschijnselen vertonen als beschreven in de Code Humane Eindpunten (zie onder J) worden de muizen direct geëuthanaseerd.

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.

Deze controles dienen volgens EU in EU lidstaat plaats te vinden, voor deze vaccinproducten vinden de controles bij ons instituut plaats, dit is vastgelegd in de productdossiers.

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.

Een deel van de dieren uit de vaccinatiegroepen en de controledieren zullen een septicaemie ontwikkelen t.g.v. een infectie met *Pseudomonas aeruginosa*. Dit leidt in over het algemeen binnen 24-48 uur tot de dood en gaat gepaard met bol zitten, lethargie, ooguitvloeiing, niet eten, niet drinken, zware schokkende ademhaling. Uiteindelijk resulterend in zwaar ademen, niet meer op de omgeving reageren. De dieren worden geëuthanaseerd voordat dit stadium wordt bereikt. Dit houdt in dat dieren bij lethargie en bol zitten worden geëuthanaseerd. In verband met het snelle verloop van de ziekte en het uitvoeren van euthanasie voordat ernstige verschijnselen optreden, wordt het niet zinvol geacht om pijnbestrijding toe te passen. Daarnaast beïnvloed pijnbestrijding de immunerespons, hetgeen niet wenselijk wordt geacht gezien de aard van het experiment.

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?

* Op dag 0 worden de dieren gevaccineerd; dit geeft een gering ongerief. * Op dag 14, 15 of 16 vindt challenge plaats met een *Pseudomonas aeruginosa* concentratie; het injecteren geeft ongerief en een deel van de muizen uit de vaccinatiegroepen en de controledieren zullen een

septicaemie ontwikkelen ten gevolge van een infectie met *Pseudomonas aeruginosa*. Dit leidt in over het algemeen binnen 24 uur tot de dood en gaat gepaard met bol zitten, lethargie, ooguitvloeiing, niet eten, niet drinken, zware schokkende ademhaling. * Euthanasie: gering ongerief.

Explain why these effects may emerge.

Het ontwikkelen van een septicaemie ten gevolge van de challenge met *Pseudomonas aeruginosa*.

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

Uitvoeren van humaan eindpunt bij muizen waarbij lethargie en bol zitten wordt waargenomen.

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.

Een humaan eind punt wordt toegepast bij de muizen welke klinische verschijnselen tonen ten gevolge van de challenge met *Pseudomonas aeruginosa*. Verschijnselen hiervan zijn bol zitten, lethargie, ooguitvloeiing, niet eten, niet drinken, zware schokkende ademhaling. Uiteindelijk resulterend in zwaar ademen, niet meer op de omgeving reageren. De muizen worden geëuthanaseerd voordat dit stadium wordt bereikt. Dit houdt in dat dieren bij lethargie en bol zitten worden geëuthanaseerd. Ook wanneer de muizen andere verschijnselen vertonen zoals beschreven in de door de diervoorzorging gehanteerde Code Humane Eindpunten worden de dieren geëuthanaseerd. Uit de Code Humane Eindpunten: Klinische symptomen en voorwaarden waarop tot het toepassen van humane eindpunten dient te worden overgegaan. 1. Elke conditie die resulteert in een lange en onomkeerbare periode waarin het dier niet kan eten of drinken b.v. - langdurige immobiliteit - obstructie van de mondholte -

geen gebit of slecht functionerend gebit 2. Ziekten of condities die aangeven dat er ernstig pijn, lijden en ongemak wordt ondergaan - fracturen - zelfverwonding - abnormale stemgeluiden - abnormale houding of beweging - open wonden of zweren 3.

Snel of voortgaand gewichtsverlies b.v. 20% of meer gedurende een paar dagen of geleidelijk maar voortgaand gewichtsverlies 4 Minder verzorgingsgedrag (grooming) en abnormaal gedrag gedurende langere tijd b.v. ruw in de haren, haaruitval, langdurig diarree, verkleuring huid en haar door urineverlies, zwellingen aan de poten, verlamming of andere door CZS of perifere zenuwen veroorzaakte uitvalsverschijnselen (stuipen, draaibewegingen) 5 Ernstige of voortdurende respiratoire verschijnselen b.v. hoesten, niezen, neusuitvloeiing, bloed in neusschelp of bek. 6 Bloedingen, bloedarmoede of ongewone en ongebruikelijke uitvloeiingen 7 Aanwijzingen van microbiële infecties of andere ziekten, zeker als deze zullen interfereren met het experimentele protocol of worden veroorzaakt door bovengenoemde aandoeningen

Indicate the likely incidence.

De muizen in groep met de laagste verdunning van het vaccin (10E-1 of onverdund) zullen redelijk beschermd zijn tegen Pseudomonas. De serotypen van Pseudomonas verschillen in virulentie en de bescherming van het vaccin verschilt dan ook iets per serotype. In de laagste verdunning zal gemiddeld genomen geen van de muizen blootgesteld aan serotype 5 ziek worden, gemiddeld drie van de groep muizen blootgesteld aan serotype 6 en gemiddeld 1 van muis blootgesteld van serotype 7/8. De muizen in de volgende verdunning (10E-2 of 10E-0.8) zijn slechts gedeeltelijk beschermd zijn tegen Pseudomonas. Voor de serotypen 5, 6, 7/8 worden van de 10 muizen per groep respectievelijk 3, 5 en 4 ziek. En van de hoogste verdunning (10E-3 of 10E-1.6) zijn dat gemiddeld genomen 7 muizen voor alle serotypen. De muizen in de controle groep worden niet gevaccineerd en zullen niet beschermd zijn tegen Pseudomonas. Gemiddeld genomen worden 8 tot 9 van de muizen uit de controle groep ziek en krijgt een HEP of sterft. Overall komt gemiddeld genomen in een proefopzet met 6 te testen vaccin batches 82% (serotype 5), 56% (serotype 6) en 76% (serotype 7/8) in aanmerking voor HEP of is al voortijdig overleden.

K. Classification of severity of procedures

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

De muizen die voldoende beschermt zijn door het vaccin ondergaan een gering tot matig ongerief. Deze muizen zijn blootgesteld aan, hanteren, vaccinatie procedure en challenge. Daarentegen krijgen de muizen welke onvoldoende zijn beschermt tegen de infectie te maken met ernstig ongerief. Dit zijn de controle muizen (alleen challenge) maar ook de muizen welke gevaccineerd worden, recht evenredig met de verdunning van het vaccin. Over het geheel genomen ondervindt 59% van de muizen een gering ongerief (euthanasie aan het einde van de proef), 14% ondergaat een matig ongerief (HEP) en 27% ernstig ongerief (overlijdt in de proef).

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.

De overgebleven muizen zullen aan het einde van het experiment worden geëthanaseerd. Met uitzondering van de controle groep zijn de muizen gevaccineerd en hebben alle muizen een challenge gehad met *Pseudomonas aeruginosa* en zijn daarom niet meer geschikt om in een andere proef gebruikt te 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.

Yes
