

	Dossier: AVD10800202317148	
		Aanwezig
1	NTS	X
2	Aanvraagformulier	X
3	Projectvoorstel	X
4	Bijlage beschrijving dierproeven	X
5	DEC-advies	X
6	Ontvangstbevestiging	X
	Evt. Vragen CCD aan aanvrager	X
	Evt. antwoorden aanvrager	X
7	Beschikking en vergunning	X

NIET-TECHNISCHE PROJECTSAMENVATTING

Naam van het project	Bacteriële contaminatie van vaccinaties toegediend in kippeneieren.
NTS-identificatiecode	NTS-NL-837443 v.1, 14-11-2023
Land	Nederland
Taal	nl
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	48
Trefwoorden	vaccinatie in het ei besmetting met bacteriën embryonale sterfte vermindering antibioticagebruik kuikenvitaliteit en gezondheid
Doel(en) van het project	Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Ziekten en aandoeningen van dieren Bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

<p>Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).</p>	<p>Vaccinaties worden veelvuldig toegepast om kippen te beschermen tegen ziekte. Een veel gebruikte manier is een vaccinatie in een ei met daarin een groeiend embryo. Dit heet in ovo vaccinatie. Deze techniek wordt in de broederij toegepast als de eieren achttien dagen bebroed zijn en het embryo zich bijna volledig heeft ontwikkeld. In ovo vaccinatie voorkomt dat de kuikens na uitkomen in de broederij, of in de pluimveestal, opgepakt hoeven te worden voor een prik. Naast deze vermindering van stress zijn de kuikens ook vroeger beschermd.</p> <p>Er zijn ook nadelen. Zo vergroot de in ovo vaccinatie het risico op het introduceren van bacteriën (besmetting van eieren met bacteriën), omdat de natuurlijke barrières van het ei worden doorbroken. De bacteriële besmetting kan plaatsvinden via verschillende onderdelen van het vaccinatieapparaat, "punch" of injectienaald, of het ei is zelf besmet waardoor de daaropvolgende eieren ook besmet kunnen raken.</p> <p>Consequenties die worden gerapporteerd bij bacteriële besmettingen na het in ovo vaccineren zijn:</p> <ol style="list-style-type: none">1) Verhoogde embryonale sterfte. Dit betekent dat minder kuikens uit het ei komen (5 % - 15%)2) Een verlengde periode van uitkomst. Dit is de tijd tussen het eerste en het laatste kuiken dat uit het ei komt. Een verlengde periode van uitkomst vermindert het welzijn van de kuikens, want het duurt langer voordat de kuikens toegang tot voer en water hebben.3) Een verhoogde sterfte van kuikens in de eerste levensweek. <p>Naast een goede hygiëne in broederijen worden, om de gevolgen van de bacteriële besmettingen te verminderen, wereldwijd veelvuldig breedwerkende antibiotica toegevoegd aan de vaccinvloeistof die wordt geïnjecteerd.</p> <p>Het doel van de studies is inzicht krijgen welke bacteriën, afkomstig uit niet uitgekomen, in ovo-gevaccineerde broedeieren, in staat zijn om late embryonale sterfte te veroorzaken in geëmbryoneerde kippeneieren.</p> <ul style="list-style-type: none">- Daarnaast zal worden gekeken of de embryonale sterfte afhankelijk is van de plek waar de bacteriën in het ei terecht komen (vruchtwater of embryo) en bij welke hoeveelheid bacteriën dit tot sterfte leidt.- Om de rol van een besmet in ovo vaccinatieapparaat te onderzoeken worden opzettelijk verschillende onderdelen besmet met bacteriën en vervolgens worden eieren geïnjecteerd. Hierna wordt er gekeken of er verschil is in embryonale sterfte.- De gestorven embryo's van alle proeven worden microscopisch onderzocht om meer inzicht te krijgen in het infectieproces dat tot sterfte leidt.
---	---

<p>Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk</p>	<p>Het project zal inzicht verschaffen in de volgende vraagstukken:</p> <ul style="list-style-type: none">- Welke specifieke bacteriën zorgen voor embryonale sterfte en in welke hoeveelheid deze bacteriën aanwezig moeten zijn om sterfte te kunnen veroorzaken?- Is de plek van injectie effect van belang en heeft het effect op de embryonale sterfte?- Heeft een besmet onderdeel van het vaccinatie-apparaat een rol bij het besmetten van
---	--

voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

geinjecteerde eieren?

Met deze kennis kunnen gericht nieuwe processen worden ontwikkeld voor broederijen om bacteriële besmetting van broedeieren te voorkomen.

Hierdoor kan het toevoegen van antibiotica overbodig worden en zullen minder embryo's in het ei en/of kuikens na uitkomst sterven aan bacteriële infecties.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Na uitkomst worden alle uitgekomen kuikens gescoord op kuikenvitaliteit en gezondheid. Hierbij zullen de dieren gehanteerd worden en wordt het volgende beoordeeld: activiteit, dons, dooieropname, ogen, poten en de navel. Ook zal de lengte van de kuikens gemeten worden (langere kuikens zijn een teken voor een betere ontwikkeling in het ei).</p> <p>Alle uitgekomen kuikens worden vervolgens zeven dagen gehouden zonder verdere interventies. Aan het eind van de deze periode worden de kuikens gedood en worden ze pathologisch en microbiologisch onderzocht. Daarnaast wordt er gekeken naar verschillen in sterfte tussen de groepen die in het ei werden geïnjecteerd met bacteriën en de groepen die geïnjecteerd werden met een oplossing zonder bacteriën.</p> <p>Naar schatting zullen 1006 van de 1552 (65%) van de eieren uitkomen. Bij het schatten van het aantal kuikens met ongerief is ervan uitgegaan dat alle kuikens uit het ei komen. Van alle kuikens die uit het ei komen zullen worden gehanteerd om de kuikenvitaliteit en gezondheid te scoren. De kuikens zullen door deze handeling lichtongerief ondervinden. Naar verwachting zal zullen 227 kuikens als gevolg van een bacteriële infectie ziek worden na het uitkomen, de inschatting van het ongerief hiervan is voor 170 kuikens matig en voor 57 dieren als ernstig. Een klein deel van de kuikens (16 dieren) zal spontaan sterven, de inschatting van het ongerief van deze dieren is ernstig. Naar verwachting zullen 8 dieren uit het ei komen met aangeboren afwijkingen die niet met het leven verenigbaar zijn, de inschatting van het ongerief is ernstig.</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Bacteriële besmetting van het ei kan een bacteriële infectie veroorzaken van het kuiken. Mogelijke ziekteverschijnselen die hierdoor kunnen optreden zijn: algehele malaise en problemen van het ademhalingsapparaat en bewegingsstelsel (pootproblemen). Ook kunnen de dieren vroegtijdig sterven. Uit eerder onderzoek is bekend dat sterfte door deze bacteriële infecties door specifieke verschijnselen vooraf wordt gegaan. Wanneer deze verschijnselen worden gezien kunnen we deze dieren vroegtijdig humaan doden om de periode van ongerief zo kort mogelijk te maken. Alle dieren worden elke zes uur (vier keer per dag) geïnspecteerd en zullen bij vertonen van deze verschijnselen, direct worden gedood.</p> <p>Elke 4 uur (zes keer per dag) wordt gecontroleerd of kuikens uit het ei zijn gekomen, indien kuikens met aangeboren afwijkingen zijn geboren worden deze direct gedood. De maximale periode van ongerief van deze kuikens is 4 uur.</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Huishoenders (Gallus gallus domesticus)</td> <td>1552</td> <td>0</td> <td>1301</td> <td>170</td> <td>81</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Huishoenders (Gallus gallus domesticus)	1552	0	1301	170	81
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Huishoenders (Gallus gallus domesticus)	1552	0	1301	170	81												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd									
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Alle dieren worden na de proef gedood vanwege de volgende redenen:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) De dieren zijn met (mogelijk) ziekmakende bacteriën besmet en men kan de mogelijkheid dat deze bacteriën verspreiden worden naar andere dieren/mensen niet uitsluiten. 2) Het is mogelijk dat de met ziekmakende bacteriën besmette vleeskuikens na de periode van de proef nog ziekteverschijnselen kunnen ontwikkelen en daar, buiten de waarnemingen van de onderzoekers, nog ongerief van kunnen ondervinden. 3) Dieren die worden aan het eind pathologisch en microbiologisch onderzocht. 																

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

Het ziekmakend vermogen van bacteriën kan getoetst worden met behulp van embryo letaliteit assay (ELA). Tijdens een ELA worden eieren met embryo's van twaalf dagen oud geïnjecteerd met bacteriën en een periode van zes dagen (tot broeddag 18) geobserveerd. Hoe meer embryo's sterven over deze periode, hoe ziekmakender de bacterie is. Deze methode wordt gebruikt om een eerste selectie te kunnen maken op het ziekmakend vermogen van de bacteriën. Een ELA is uitgevoerd met een selectie van bacteriën die gevonden zijn in geëmbryoneerde eieren die gestorven zijn nadat deze in het ei waren gevaccineerd. Door het uitvoeren van de ELA kan het aantal bacteriën dat gebruikt wordt in de dierproef worden verminderd. Bacteriën die een laag ziekmakend vermogen hebben, hoeven niet te worden getest in de dierproef. Echter is een ELA slechts een screeningsmethode en is niet geschikt om de daadwerkelijke onderzoeksvraag te beantwoorden omdat de eieren in de praktijk op dag 18 worden gevaccineerd en dit dus ook als het moment van besmetting gezien wordt. Het afweersysteem van deze dieren is in dit stadium van de embryo-ontwikkeling veel verder ontwikkeld waardoor de effecten van bacteriële contaminatie niet te vergelijken zijn. Daarnaast is het met dit model onmogelijk om kuikenvitaliteit en gezondheid in de eerste week te monitoren omdat deze dieren niet uitkomen.

2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Vóór de dierexperimenten is getest welke typen bacterie nodig zijn in de dierproef. Hiervoor is een embryo letaliteit assay (ELA) uitgevoerd om het ziekmakend vermogen te bepalen van bacteriën die afkomstig zijn van geëmbryoneerde eieren die gestorven zijn na vaccinatie in het ei. Door deze ELA uit te voeren kunnen bacteriën die geen rol spelen in de embryonale sterfte worden uitgeselecteerd. Hierdoor zullen we minder verschillende bacteriën hoeven te testen in de dierproef. Dit zorgt ervoor dat er geen onnodige experimentele groepen gecreëerd zullen worden en dus minder proefdieren nodig zijn. Daarnaast kan indien nodig de verwachte effect grootte die gebruikt is voor het berekenen van de steekproefomvang worden bijgesteld met de kennis uit de embryo letaliteit assay.

De verschillende dierexperimenten zijn opeenvolgend ingepland. Hierdoor kan het aantal experimentele groepen drastisch verminderd worden, omdat de volgende experimenten slechts uitgevoerd worden met de bacterie-isolaten en de concentraties die in de voorgaande experimenten relevant zijn gebleken.

3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

Om het ongerief na/tijdens uitkomst te voorkomen, zullen alle eieren vanaf dag 19.5 van het broedproces elke vier uur geïnspecteerd worden. Hierdoor zullen vroeg uitgekomen kuikens (voor dag 21) slechts een korte tijd in de uitkomstkamer doorbrengen. Dieren die als gevolg van de injectie een bloedvergiftiging ontwikkelen kunnen hiervan ongerief ervaren. Deze dieren zullen direct uit de proef gehaald worden. Uit eerder onderzoek is gebleken dat het mogelijk is om aan de hand van specifieke verschijnselen te voorspellen of kuikens zullen gaan sterven. Deze specifieke verschijnselen zijn een combinatie van afwijkend(e) voortbewegen, houding, uiterlijk en interactie met andere kuikens. Het is hiermee mogelijk om, zonder de resultaten van de proef te beïnvloeden (aangezien deze dieren meegeteld kunnen worden als kuikensterfte, wat in deze proef moet worden gemeten), deze dieren direct humaan te doden. Alle dieren worden in de eerste levensweek elke zes uur geïnspecteerd en er wordt bepaald of deze verschijnselen aanwezig zijn.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

De problemen met besmette eieren na vaccinatie in het ei wordt met name gezien bij vleeskuikens. Daarom is er gekozen om met vleeskuikens te werken in deze dierproef. Er worden eieren van vleeskuikens van het merk Ross 308 gebruikt omdat deze vleeskuikens het meest in de praktijk

gebruikt worden, zodoende wordt er zo dicht mogelijk bij de praktijksituatie gebleven. De eieren worden vanuit een commerciële broederij getransporteerd naar de onderzoeksfaciliteiten. Vervolgens worden de eieren bebroed tot uitkomst en na uitkomst worden de kuikens in een experimentele stal geplaatst en verzorgd tot zeven dagen leeftijd, om in de eerste levensweek de kuikenvitaliteit/gezondheid en sterfte te kunnen meten. We gebruiken achttien dagen bebroedde geëmbryoneerde eieren. Op deze embryonale leeftijd wordt de in ovo-vaccinatie altijd uitgevoerd.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	01-06-2028
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	ja
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	
--	--



Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	10800
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3	
		<input type="checkbox"/> Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1	
		<input type="checkbox"/> Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2	
1.3	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie Universiteit Utrecht	
		Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel Voorletters Achternaam <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres contactpersoon	info@ivd-utrecht.nl
		Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel Voorletters Achternaam <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres gemachtigde	
	Vul de gegevens van het postadres in.	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht 50
		Postcode en plaats	3584CJ UTRECHT
		Postbus, postcode en plaats	80125 3508TC UTRECHT
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	Population Health Science
		Telefoonnummer	

1.5	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	E-mailadres	[REDACTED]
		(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	Population Health Science
1.6	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	E-mailadres	[REDACTED]
		(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
1.7	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer	030-2531569
		E-mailadres	info@ivd-utrecht.nl
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > <i>Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i> <input checked="" type="checkbox"/> Nee	

2 Over uw aanvraag

2.1	Gaat uw aanvraag over een <i>wijziging</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2	Gaat uw aanvraag over een <i>melding</i> op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	1 - 6 - 2023
		Einddatum (t/m)	1 - 6 - 2027
3.2	Wat is de titel van het project?	Bacteriële contaminatie van in ovo toegediende vaccinaties	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Bacteriële verontreiniging van in ovo toegediende vaccinaties	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?	Naam DEC	DEC Utrecht
		Postadres	Postbus 85500 3508 GA Utrecht
		E-mailadres	dec-utrecht@umcutrecht.nl

4 Factuurgegevens

- 4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.
- Naam: UU-ASC Afdeling:
 Straat: Huisnummer:
 Postcode: Plaats:
 Postbus: 80.011 Postcode: 3508TA Plaats: UTRECHT
 E-mail: asc.factuur@uu.nl
- 4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.
- Ordernummer:
 CB.841910.3.01.011

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel Aantal bijlage(n) dierproeven 1
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
-

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)
- Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel C van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

Functie

Plaats

Utrecht

Datum

Handtekening



Formulier

Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800
1.1 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht
1.3 Vul de titel van het project in.	Bacteriële contaminatie van in ovo toegediende vaccinaties

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2.1 aangekruiste categorieën.

Om ziekten in de pluimveehouderij te beperken is het nemen van preventieve maatregelen erg belangrijk. Naast bio-veiligheid is het vaccineren tegen ziekten een veel gebruikt middel om de consequenties van een infectie te verminderen of volledig te voorkomen. Het voorkomen van ziekten komt de gezondheid en welzijn van de dieren ten goede. Tegelijkertijd wordt hiermee de dierhouderij veel duurzamer. Namelijk, als dieren gezonder zijn kunnen meer dieren tot goede productie komen, de dieren zullen het gebruikte diervoeder beter benutten en omzetten in groei of het produceren van eieren. Door dieren gezond te houden zullen minder dieren nodig zijn en zullen minder medicijnen, zoals antibiotica, worden gebruikt.

Daarnaast leveren gezondere dieren een gezonder product op. Dit komt ten goede aan de voedselzekerheid (ook in armere landen) en voedselveiligheid voor de snel groeiende wereldbevolking. Kippenproducten zijn hoogwaardige bronnen van eiwit met een veel lagere koolstofvoetafdruk dan bijvoorbeeld varkens- en koeienproducten. Daarom is er veel aandacht voor preventieve maatregelen, zoals bio-veiligheid en vaccinaties, in de hele pluimveeketen. Omdat niet alle ziekteverwekkers geheel met goede bio-veiligheid kunnen worden uitgebannen is vaccinatie één van de belangrijkste middelen die we hebben om zowel leghennen als vleeskuikens zo gezond mogelijk te houden.

Vaccins kunnen via verschillende routes worden toegediend. Dit kan via massa-applicatie doormiddel van spray, aerosol of drinkwater, waarbij vaak gebruik gemaakt wordt van levende geattenuerde (verzwakte) vaccins. Een nadeel van massa-applicatie is dat hierbij niet altijd alle dieren goed worden bereikt door het vaccin, waardoor de bescherming in het koppel kan tegenvallen. Daarnaast kunnen kippen ook individueel worden gevaccineerd door middel van een injectie-enting. Dit proces is arbeidsintensief omdat dieren individueel dienen te worden gehanteerd. Voor de kippen geeft dit proces ook veel extra stress door het vangen en prikken. Ook is er altijd een kans op het maken van fouten (zoals op een verkeerde plek prikken). Wanneer de individuele vaccinatie goed wordt uitgevoerd, en alle kippen succesvol worden gevangen en geprikt, is in theorie de kans dat een individueel dier gevaccineerd wordt nagenoeg 100%.

Sinds de jaren negentig van de vorige eeuw worden steeds meer kippen in het ei gevaccineerd. Dit heeft veel voordelen (zie bv <https://www.my-msd-animal-health.nl/pluimvee/management/in-ovo-vaccinatie/>). De kuikens zijn veel eerder beschermd en hoeven geen stressvolle vaccinatie te ondergaan bij leven. Daarnaast is een ei makkelijk hanteerbaar, waardoor het vaccinatieproces te automatiseren is. Het machinaal injecteren maakt ook de kans op fouten veel kleiner. Dit gebeurt in 18 daags bebroede eieren, met als doel het vaccin in de amnion vloeistof of het embryo te injecteren. Voordelen van deze techniek zijn de zekerheid dat alle eieren met de juiste dosis en op de juiste plek individueel worden gevaccineerd. Er treedt ook weinig verlies op van vaccin (in tegenstelling tot bv. massa-applicatie met een spray of aerosol) waardoor farmaceutische bedrijven minder vaccin hoeven te maken.

In ovo vaccinaties worden op dit moment voornamelijk toegepast in vleeskuikens die volgens verschillende normen worden gehouden, denk hierbij aan de conventionele en biologische houderij of kuikens die volgens een bepaald concept worden gehouden (bv beter leven ster, volwaard, etc.).

De verwachting is dat het in ovo vaccineren toe zal nemen. De vaccins die zijn ontwikkeld, en op dit moment worden geregistreerd, ter preventie van hoog pathogene vogelgriep zullen voor een groot deel in ovo worden toegediend (Gardin *et al.*, 2016, Reemers *et al.*, 2021). Daarnaast zullen er meer leghennen in ovo gevaccineerd gaan worden, dit omdat het geslacht van leghennen in het ei al bepaald kan worden. Hierdoor is het mogelijk om alleen de hennen te vaccineren, voorheen was het niet rendabel om beide geslachten te vaccineren, de hanen worden niet gebruikt voor voedselproductie en worden direct na uitkomst gedood.

Het ei heeft verschillende barrières om het embryo te beschermen tegen potentiële ziekteverwekkers (pathogenen). Van buiten naar binnen zijn er verschillende lagen die bescherming bieden. Dit zijn onder andere: de cuticula, eischal en schaalmembranen. Tijdens in ovo vaccinatie worden de natuurlijk barrières van het ei doorbroken, waardoor er mogelijk microbiële contaminatie in het ei kan optreden. Dit onderstreept het belang van hygiëne tijdens het vaccinatieproces. Ook op het bedrijf waar de moederdieren de broedeieren leggen wordt al getracht de besmeuring van eieren met mest tot een minimum te beperken zodat de broedeieren zo schoon mogelijk in de broederij aankomen. In de broederij wordt goed gekeken of de eieren schoon genoeg zijn en worden ~~de~~ alle eieren gedesinfecteerd met waterstofperoxide gas voordat ze in de broedmachine gaan.

In de omgeving van broederijen, en met name in de uitkomstkasten, komen ondanks al deze maatregelen veelvuldig bacteriën voor (Kim & Kim, 2010). De voornaamste bacteriën die worden aangetoond zijn *Enterococcus faecalis* en *Escherichia coli*. Beide bacteriën zijn gekende pathogenen die ziekteverschijnselen in jonge dieren kunnen veroorzaken. *E. faecalis* is geassocieerd met amyloïde artropathie (een pijnlijke chronische gewrichtsontsteking) in leghennen en moederdieren (Landman *et al.*, 2001), terwijl *E. coli* de meest voorkomende oorzaak is voor sterfte in de eerste levensweek van zowel leghennen als vleeskuikens (Olsen *et al.*, 2012, Kemmet *et al.*, 2014, Walker *et al.*, 2020). Beide bacteriën worden ook veelvuldig geïsoleerd uit

geëmbryoneerde vleeskuikeneieren waarvan het embryo tijdens het broedproces is afgestorven (Karunaratna *et al.*, 2017).

Het toepassen van in ovo vaccinatie vergroot het risico op het introduceren van bacteriën in de laatste fase van het broedproces. Consequenties die in het veld worden gerapporteerd bij bacteriële contaminatie na het in ovo vaccineren zijn:

- Embryonale sterfte is 5% hoger in vergelijking met embryo's van vergelijkbare koppels die niet gevaccineerd zijn. In extreme casus kan dit oplopen tot 15%. Normale embryonale sterfte vanaf dag 18 is 2-3%.
- Een verlengde periode van uitkomst (hatch window), dit is de tijd tussen het eerste kuiken dat uit het ei komt en het laatste kuiken dat uit het ei komt.
- Een verhoogd sterftepercentage bij vleeskuikens in de eerste levensweek.

Om de gevolgen van de bacteriële contaminatie te verminderen wordt er wereldwijd veelvuldig een breedwerkend antibiotica toegevoegd aan de vaccinloeistof die wordt geïnjecteerd.

Het is onbekend welke pathofysiologische processen er voorafgaan aan de sterfte van kippenembryo's door bacteriële contaminatie. Omdat het tot nu toe onduidelijk is welke organen en weefsels er gekoloniseerd worden door de bacteriën en waardoor de embryo's uiteindelijk doodgaan is er meer inzicht nodig in deze processen. Wanneer de pathofysiologische processen beter begrepen worden kan er in de toekomst beter en gericht onderzoek gedaan worden naar dit probleem, die mogelijk kunnen leiden tot manieren om deze processen te beïnvloeden.

In een eigen uitgevoerde studie (verder genoemd veldstudie) is gekeken welke bacteriën verantwoordelijk zijn voor embryonale sterfte na in ovo vaccinatie. Hiervoor zijn liggenblijvers (niet uitgekomen eieren) verzameld, waarvan het moment van embryonale sterfte en macroscopische afwijkingen zijn bepaald. Daarnaast zijn van 30 liggenblijvers per inzending monsters genomen voor bacteriologisch onderzoek. In totaal zijn 7 inzendingen ingestuurd. Deze waren afkomstig van Nederlandse en Belgische broederijen waarbij geen antibiotica was toegevoegd aan de vaccinloeistof. *E. faecalis* en *E. coli* waren de bacteriën die het meest zijn geïsoleerd uit de liggenblijvers. Deze bacterie isolaten zijn opgeslagen voor verdere onderzoeken.

Niet alle bacteriën zorgen voor ziekte na introductie in een gastheer. Zelfs binnen één bacteriesoort, bv *E. coli*, verschilt het ziekmakend vermogen (virulentie). Om de virulentie van bacteriën te toetsen kan gebruik worden gemaakt van een embryo letaliteit assay (ELA) (Borst *et al.* 2014, Landman *et al.* 2021, Manders *et al.* 2022). In een ELA worden verschillende bacteriën geïnoculeerd in één van de compartimenten van het geëmbryoneerde ei, vaak in de allantois holte, van 12 dagen bebroede eieren. Gedurende zes dagen na inoculatie zal worden gekeken of het embryo in het ei nog levend is. Embryonale sterfte is de belangrijkste uitleesparameter, waarbij virulente bacteriën zorgen voor een hoger sterftepercentage. Geïsoleerde bacteriën uit de veldstudie zullen worden onderzocht in een ELA om te bepalen welke bacteriën mogelijk virulent kunnen zijn voor kippenembryo's van 18 dagen oud. Deze bacterie-isolaten zullen worden geselecteerd voor de dierproeven van deze projectaanvraag.

Wanneer er meer bekend is over welke soorten bacteriën, in welke hoeveelheden en via welke route (welke onderdelen van de vaccinatie-apparatuur) de grootste risico's vormen tijdens het in ovo vaccineren en een grote impact hebben op de sterfte van embryo's en de kuikens in de eerste week, kunnen er meer specifieke maatregelen worden genomen op verschillende plekken in de pluimveeketen. Denk hierbij aan maatregelen die de kans op en/of de hoeveelheid contaminatie van de eieren met deze specifieke bacteriën kunnen verminderen. Afhankelijk van de uitkomsten kunnen maatregelen genomen worden op het moederdierbedrijf, denk hierbij bijvoorbeeld aan de broedeiproductie en/of management van legnesten, en in de broederij, bijvoorbeeld het bestrijden van specifieke bacteriën, toepassen van andere desinfectiemiddelen of aanpassingen aan de vaccinatie-apparatuur. Daarnaast kan de farmaceut aanpassingen aan de vaccinoplossingen doorvoeren om specifieke bacteriegroei tegen te gaan. Dit vermindert de kans dat antibiotica moet worden toegepast (in broederij of op het pluimveebedrijf) en dit komt het dierwelzijn, diergezondheid en de duurzaamheid van de pluimveehouderij ten goede.

3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

- Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

Het directe doel van de studie is inzicht krijgen welke processen en specifieke bacteriën bij in ovo vaccinatie bepalend kunnen zijn voor bacteriële contaminatie die leiden tot verhoogde embryonale sterfte en sterfte in de eerste levensweek. Indien deze processen inzichtelijk zijn, kunnen specifieke preventieve maatregelen genomen worden in broederijen en/of op moederdierbedrijven om contaminatie van het in ovo vaccinatie proces te voorkomen. Deze maatregelen kunnen er toe leiden dat er minder antibiotica hoeft te worden gebruikt in de pluimveeketen. Daarnaast zal het welzijn en de gezondheid van eendagskuikens verbeteren en vermindert het zowel embryonale sterfte als sterfte in de eerste levensweek.

Subdoelen van dit project zijn:

- Bepalen welke bacteriën embryonale sterfte kunnen veroorzaken na inoculatie op dag 18 van het broedproces.
- Bepalen welke bacteriën kuikensterfte in de eerste levensweek kunnen veroorzaken na inoculatie van bacteriën op dag 18 van het broedproces.
- Bepalen of de hoeveelheid bacteriën invloed heeft op de tijd tot het moment van sterfte, dit kan zijn embryonale sterfte of sterfte in de eerste levensweek.
- Vaststellen of de locatie (amnionholte of embryo) van het inoculeren van bacteriën in het ei verband houdt met embryonale sterfte en sterfte in de eerste levensweek.
- Vaststellen of de plek van contaminatie van het in ovo vaccinatie apparaat verband houdt met embryonale sterfte en sterfte in de eerste levensweek.
- Inzicht verkrijgen in welke pathofysiologische processen betrokken zijn bij de sterfte van embryo's en kuikens door histologisch onderzoek uit te voeren op afgestorven embryo's en kuikens.

Ondanks de uitgebreide bio-veiligheidsmaatregelen die worden genomen in een broederij worden er veel verschillende soorten bacteriën aangetoond in de interne omgeving van broederijen. Dezelfde bacterie soorten kunnen worden geïsoleerd uit geëmbryoneerde kippeneieren die in ovo gevaccineerd zijn. Echter is het onbekend welke specifieke bacteriën het vermogen bezitten om na inoculatie in een laat stadium (vanaf dag 18 van het broedproces) embryonale sterfte te veroorzaken.

Het uiteindelijke doel is het inzichtelijk krijgen van negatieve effecten van in ovo vaccinatie op embryonale sterfte, sterfte in de eerste levensweek en kuikenkwaliteit. Op dit moment wordt er wereldwijd nog antibiotica toegevoegd aan vaccinvloeistoffen voordat deze in ovo worden gevaccineerd om sterfte te verminderen. Door middel van deze studie wordt er kennis vergaard om op een broederij specifieke maatregelen te nemen tegen bacteriële contaminatie. Met het nemen van deze maatregelen wordt de noodzaak om antibiotica toe te dienen aanzienlijk minder en kan er mogelijk gestopt worden met het toevoegen van antibiotica aan de vaccinvloeistof en kan het welzijn en gezondheid van de vleeskuikens mogelijk verbeteren.

3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

Het project borduurt voort op de kennis van eerdere en lopende onderzoeken van en door leden van de onderzoeksgroep en geraadpleegde literatuur. De groep bestaat uit medewerkers van de Universiteit Utrecht-faculteit Diergeneeskunde, een onafhankelijk (wetenschappelijk) consultant en een farmaceutisch bedrijf.

_____ bezitten een brede kennis over de pluimveehouderij, bacteriële infecties bij pluimvee en over het (in ovo) vaccineren van kippen(eieren).

De afgelopen jaren zijn al experimenten uitgevoerd om de inoculatie techniek en de succespercentages daarvan in de geëmbryoneerde eieren op verschillende leeftijden te onderzoeken (_____. Deze resultaten zijn gebruikt om de virulentie van verschillende bacteriën te toetsen in een ELA _____

De wetenschappelijk consultant is een ervaringsdeskundigen, die in de praktijk broederijen adviseert op basis van (eigen)onderzoek en literatuuronderzoek. Daarnaast hebben de twee partners jaren ervaring met het

toedienen van in ovo vaccinatie en over de nadelige gevolgen van bacteriële contaminatie van het vaccin. Bij deze partners is veel kennis aanwezig over het vaccinatie proces op de broederij. Histologisch onderzoek zal worden uitgevoerd door Europees gespecialiseerde veterinaire pathologen van de faculteit Diergeneeskunde. De proeven zullen worden uitgevoerd in onderzoeksfaciliteiten waar ruime ervaring is met het uitbroeden van kuikens en het uitvoeren van dierexperimenten met vleeskuikens.

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet-en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

[Click or tap here to enter text.](#)

3.3 Belang

3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

Wetenschappelijk belang:

Wetenschappelijke kennis is op dit moment schaars of niet aanwezig omtrent bacteriële contaminatie tijdens de in ovo vaccinatie. De noodzaak tot onderzoek was tot voorkort klein omdat veel problemen konden worden gemaskeerd door het gebruik van antibiotica.

In broederijen komen veel bacteriën voor, steriel werken is in een broederij nagenoeg onmogelijk. Broedeieren worden gelegd in een omgeving waar bacteriën aanwezig zijn. Deze bacteriën kunnen in poriën van de eischaal terecht komen na het leggen van het ei. Tijdens het broedproces zijn er gunstige temperaturen voor deze bacteriën om te vermenigvuldigen, waarna deze verder in de broederij kunnen verspreiden.

Op dit moment is het niet gekend welke bacteriën zorgen voor late embryonale sterfte. Bacteriën kunnen op meerdere plekken in de pluimveeketen voor problemen zorgen. Dit onderzoek zal informatie geven over welke type bacteriën in de broederij (schakel in de pluimveeketen) daar specifiek voor problemen zorgen. Deze kennis kan worden gebruikt voor onderzoek in andere schakels van de pluimveeketen.

Daarnaast is het onbekend hoe snel na contaminatie tijdens het in ovo vaccineren deze bacteriën tot sterfte leiden. Is dit nog tijdens het broedproces of treedt er sterfte op in de eerste levensweek op het vleeskuikenbedrijf (volgende schakel in de pluimveeketen)? Hierbij is het mogelijk dat een lagere concentratie van bacteriën kan leiden tot een verlengde periode tot sterfte. Door preventieve maatregelen kan de bacteriële contaminatie verminderen (lagere concentratie) maar wordt sterfte niet voorkomen maar verplaatst van de broederij (embryonale sterfte) naar het vleeskuikenbedrijf (sterfte in de eerste levensweek).

Pathofysiologische processen die ten grondslag liggen aan embryonale sterfte zijn nog onvoldoende gekend. Een eerste stap om deze processen inzichtelijk te maken worden geïmplementeerd in deze studie.

Maatschappelijke belang:

Wereldwijd is kippenvlees een zeer belangrijke eiwitbron en de consumptie van kippenvlees is nog steeds stijgende. Jaarlijks worden er naar schatting 80 miljard eieren uitbroed voor de productie van vlees en eieren. Om deze kippen te beschermen tegen infectieziekten worden deze dieren veelvuldig gevaccineerd, waarbij deze vaccinaties bij steeds meer kippen in het ei worden toegediend.

Voordelen van het toedienen van vaccinaties in het ei zijn: verminderde handelingen inclusief een injectie aan dieren en accuratere vaccinatie. Dit alles resulteert in een beter welzijn en gezondheid van kuikens.

In ovo vaccinatie wordt op dit moment met name nog ingezet bij dieren voor vleesproductie maar gezien de technologische ontwikkelingen van het in ovo sexen van leghennen is de verwachting dat het aantal dieren dat in ovo gevaccineerd wordt alleen maar zal toenemen. Op dit moment worden leghennen nog niet gevaccineerd omdat de helft van de dieren mannelijk is, waardoor er verlies van vaccin optreedt indien alle geëmbryoneerde eieren gevaccineerd dienen te worden.

De vaccins tegen hoog pathogene vogelgriep die op dit moment worden geregistreerd zijn van het type dat in het ei gevaccineerd kan worden of via injectie direct na uitkomst van de kuikens. Indien deze vaccins geregistreerd zijn zullen zowel in Europa als wereldwijd naar verwachting nog veel meer dieren in ovo gevaccineerd worden.

Wereldwijd zijn er steeds meer problemen met antimicrobiële resistentie. Tegen sommige bacteriën zijn geen effectieve antibiotica meer beschikbaar. Het is daarom van belang om zo min mogelijk antibiotica te gebruiken om resistentie ontwikkeling tegen te gaan. Alles moet er dus op gericht zijn om zo min mogelijk resistentieontwikkeling te hebben wanneer antibiotica ingezet moeten worden. Op dit moment zijn de gevolgen, in sommige broederijen, groot wanneer geen antibiotica aan vaccinvoeistof wordt toegediend. Op dit moment wordt er veelvuldig breed spectrum antibiotica toegediend omdat deze, zonder dat bekend hoeft te zijn welke bacteriën voor problemen zorgen, voor een vermindering van de problemen in de broederij zorgen. Het gebruik van deze, breed spectrum antibiotica kan een verhoogd risico op de ontwikkeling van antibiotica resistentie geven. De noodzaak om antibiotica toe te dienen zal mogelijk afnemen indien meer inzicht is tijdens welke processen van in ovo vaccinatie bacteriële contaminatie plaatsvindt. Mogelijk kan met de resultaten van deze dierproeven verantwoord gestopt worden met het gebruik van antibiotica ten tijde van het vaccineren in het ei en heeft het geen nadelige gevolgen voor de gezondheid van de kuikens.

De belangrijkste gevolgen van bacteriële contaminatie van de in ovo vaccinatie zijn voornamelijk een lager uitkomstpercentage en meer sterfte in de eerste levensweek. Dit betekent dat om dezelfde vleesproductie te waarborgen een grotere hoeveelheid eieren in broedmachines ingelegd moeten worden. Hierdoor zullen de kosten voor pluimveeproducten stijgen en belangrijker, er zijn meer moederdieren nodig om broedeieren te produceren, wat zorgt voor een hogere impact op het milieu.

Aan de hand van de resultaten van dit onderzoek hopen we dat er aanpassingen kunnen worden doorgevoerd in de pluimveesector die een directe bijdrage leveren aan het verbeteren van welzijn en de diergezondheid van kuikens in de eerste levensweek. Waarbij de noodzaak voor het gebruik van antibiotica zowel in broederijen als in de eerste levensweek verder afneemt in alle sectoren van de pluimveehouderij, zowel gangbaar als biologisch.

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

- Veterinaire Volksgezondheid:
Door middel van deze studie wordt er kennis vergaard om op een broederij specifieke preventieve maatregelen te nemen tegen bacteriële contaminatie tijdens in ovo vaccinatie. Door deze maatregelen wordt de noodzaak om antibiotica toe te dienen aan vaccinvoeistof in de broederij of door de pluimveehouder in de eerste levensweek aanzienlijk minder. Het verminderen van preventief antibiotica gebruik draagt bij aan verminderde ontwikkeling van antibiotica resistentie wat belangrijk is voor zowel de humane als de veterinaire gezondheidszorg.
- Producenten van machines voor in ovo vaccinaties:
De opgedane kennis uit het onderzoek zal producenten van in ovo vaccinatie machines helpen het ontwerp van deze machines te verbeteren. Specifieke kennis over wanneer, hoe en bij welke hoeveelheid bacteriën eieren kunnen infecteren helpt de leveranciers in het verbeteren van deze apparaten.
- Broederijen:
In broederijen worden in verschillende monsters (o.a. luchtmonsters) vaak bacteriën (o.a. *E. faecalis* en *E. coli*) aangetroffen. Het is aannemelijk dat de broederijomgeving een bron van bacteriële contaminatie kan zijn. Resultaten uit dit onderzoek kunnen leiden tot preventieve maatregelen die broederijen kunnen toepassen ter preventie van contaminatie. Daarnaast zullen de resultaten uit dit onderzoek mogelijk leiden tot een verminderde embryonale sterfte en sterfte in de eerste levensweek. Broederijen zullen minder broedeieren nodig hebben voor hetzelfde aantal kuikens.
- Onderzoekers/onderzoeksgroep:
De kennis van de onderzoekers op dit onderwerp zal toenemen. Deze kennis kan ingezet worden voor het onderwijs aan studenten van de faculteit Diergeneeskunde. Daarnaast heeft de onderzoeksgroep een financieel belang, zij worden betaald voor het uitvoeren van dit onderzoek.
- Pluimveesector:
Broedeieren worden geproduceerd door ouderdieren. De broedeieren worden in een niet steriele omgeving gelegd. Deze omgeving kan een mogelijk bron zijn van bacteriële contaminatie van de eischaal. Resultaten kunnen worden gebruikt om verder onderzoek te verrichten naar innovatieve maatregelen om de kans op contaminatie op het ouderdierenbedrijf te verminderen. Ongeacht of het om vleeskuikens of leghennen gaat kan de embryonale sterfte toenemen als gevolg van bacteriële

contaminatie van in ovo vaccinatie. Hierdoor zijn meer ouderdieren en grootouderdieren nodig om tot hetzelfde aantal dieren, om uit te broeden, te komen. Deze verminderde efficiëntie (meer dieren voor dezelfde hoeveelheid dierlijk eiwit) heeft een negatief effect op veel factoren zoals klimaat (uitstoot), mogelijk dierwelzijn (meer dieren = meer kans op verminderd dierwelzijn) en een hogere prijs voor dierlijk eiwit. Het verhogen van het uitkomstpercentage zorgt voor een hogere efficiëntie en dus een vermindering van bovengenoemde problemen.

- Embryo's in het ei en vleeskuikens:

De gezondheid en daarmee ook het welzijn van embryo's in het ei en vleeskuikens zal verbeteren als er minder dieren geïnfecteerd raken met bacteriën tijdens de in ovo vaccinatie.

- Consument:

De Consument heeft meer beschikking tot producten van gezonde kippen uit een meer duurzaam systeem, waarbij minder antibiotica wordt gebruikt en dus minder kans is op resistente bacteriën. Door het verminderen van het aantal dieren dat sterft zijn er minder (ouder- of grootouder-) dieren nodig om dezelfde productie te kunnen genereren, hierdoor zal er minder uitstoot van broeikasgassen zijn.

- Farmaceutische bedrijven:

Producenten van vaccins kunnen met kennis uit deze onderzoeken hun vaccin vloeistof aanpassen zodat bacteriën daar minder makkelijk in groeien. Samen met de producenten van in ovo vaccinatie apparaten kunnen zij nieuwe strategieën bedenken om de kans op contaminatie te verminderen zonder antibiotica toe te voegen aan de vaccinvloeistof.

- Proefdieren:

Proefdieren hebben een negatief belang, deze dieren zullen bewust worden geïnfecteerd wanneer deze nog in het ei zitten. Voor de te gebruiken proefdieren is het van belang dat de inzet van deze proefdieren bijdraagt aan een oplossing van het hiervoor geschetste probleem. Daarnaast is het voor de proefdieren van belang dat zij zo min mogelijk ongerief ervaren en als de dieren ongerief ervaren dat deze tijd zo kort mogelijk is. Hiervoor zullen de dieren iedere 6 uur worden geïnspecteerd en zullen de handelingen door bekwaam personeel worden uitgevoerd.

3.4 Strategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en besliscriteria.

Veldstudie (geen dierproef):

Tijdens de veldstudie zijn liggenblijvers (niet uitgekomen eieren aan het einde van het broedproces) verzameld op broederijen. Deze eieren zijn op dag 18 in ovo gevaccineerd zonder dat er antibiotica aan vaccinvloeistof is toegediend. Op deze eieren is macroscopisch en bacteriologisch onderzoek uitgevoerd. Geïsoleerde bacteriën zijn verzameld en opgeslagen voor verder onderzoek. Ongeveer uit één derde van de monster kon een bacterie worden geïsoleerd. Van deze bacteriën was ongeveer 60% *E. coli* of *E. faecalis* of een combinatie van deze twee bacteriën. In het veld (broederijen) wordt een hoge mate embryonale sterfte (>5%) ten gevolgen van deze bacteriën is waargenomen [REDACTED]. Voor de verdere studies worden deze twee bacterie soorten gebruikt. Per koppel (eieren met dezelfde moederdieren) worden maximaal 3 verschillende isolaten per bacteriesoort geselecteerd. In totaal zijn er eieren van 10 koppels onderzocht die zijn uitgebreed en gevaccineerd in 4 verschillende broederijen.

Embryo letaliteit assay (ELA) (geen dierproef):

De virulentie van de geselecteerde bacteriën zullen worden getoetst in een ELA. Op basis van de resultaten van de ELA zullen zowel één zeer virulente (++) als één mild virulente *E. coli* (+) worden geselecteerd. Dezelfde selectie zal plaatsvinden voor *E. faecalis*. Bacterie-isolaten in de ELA worden geclassificeerd op basis van virulentie ten opzichte van elkaar. [REDACTED]

Een bacterie-isolaat wordt als virulent (+) geclassificeerd indien er 30-60% embryonale sterfte in de ELA wordt waargenomen. Bij >60% embryonale sterfte in de ELA zal het isolaat als hoog virulent worden geclassificeerd. Wanneer er geen significant verschil met de controle groep aangetoond wordt in de ELA zal de bacterie-isolaat als niet pathogeen geclassificeerd worden.

Een ELA is een screeningsmethode om de virulentie van bacteriën in te schatten (Nolan *et al.*, 1992, Gibbs en Wooley, 2003, Landman *et al.*, 2021). Echter is het immuunsysteem van een embryo van 12 dagen oud nog niet zo goed ontwikkeld in vergelijking met een embryo van 18 dagen oud (Hincke *et al.*, 2019). Hierdoor wordt verwacht dat sterfte op embryo dag 18 lager liggen dan op dag 12 na inoculatie van bacteriën. Wanneer uit de ELA blijkt dat een bacterie laag virulent is (geen/weinig embryonale sterfte) zal dit ook geen of weinig sterfte geven in embryo's van 18 dagen oud.

Daarnaast is het in een ELA niet mogelijk om andere negatieve gevolgen van een bacteriële contaminatie te meten, dit zijn verminderde kuikenkwaliteit en een verlengde hatch window.

Go no-go moment (1):

- Wanneer er op basis van de ELA geen virulente isolaten gedefinieerd kunnen worden zullen de dierexperimenten niet worden uitgevoerd (no go).
- Het aantal virulente isolaten dat gevonden wordt zal bepalend zijn voor het aantal groepen in dierproef 1, met een maximum van 8 groepen.

In vitro studie (geen dierproef):

Voorafgaand aan de dierproeven zal er een in vitro studie uitgevoerd worden.

Het doel van dit experiment is om aan te tonen of het mogelijk is bacteriën over te dragen doormiddel van het in ovo vaccinatie systeem.

De bacteriën die in voorgaande experimenten zijn gebruikt worden op verschillende plekken van de in ovo vaccinatie machine aangebracht. Dit zijn de naald waarmee het gat in de eischal wordt gemaakt en de injectienaald waarmee daadwerkelijk wordt gevaccineerd. Daarnaast zal een gecontamineerd ei als bron van besmetting worden gebruikt.

Om de overdracht van bacteriën aan te tonen zal gebruik gemaakt worden van groeimedium in plaats van geëmbryoneerde eieren. Naast het gebruik van groeimedium zal er ook gebruik gemaakt worden van amnion vloeistof. In ovo vaccinaties vinden in de meeste gevallen plaats in de amnion holte. Om het mogelijk remmend effect op bacteriële overdracht te toetsen zal dit medium ook in de in vitro studie worden onderzocht. Om de overdracht van (kleine hoeveelheden) bacteriën kunnen aantonen is er gekozen voor het gebruik van groeimedium. Indien er overdracht van bacteriën zal zijn kan doormiddel van het gebruik van amnion vloeistof aangevuld met bacterie tellingen de hoeveelheid van overdracht worden onderzocht. Na de initiële contaminatie zal voor 5 opeenvolgende injecties worden onderzocht of er bacteriële overdracht plaatsvindt.

Resultaten uit dit onderzoek zullen aantonen of het mogelijk is om en in welke hoeveelheid bacteriën via het in ovo vaccinatie apparaat over gedragen kunnen worden.

Go- no go moment (2):

- Wanneer er geen bacterie overdracht wordt aangetoond is dit een no/go moment voor de dierproeven.

Dierproeven (dit project):

Dierproef 1:

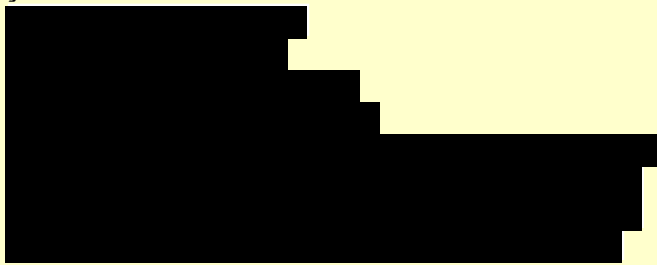
Doel van dierproef 1 is om te onderzoeken of de verschillende bacterie-isolaten (of combinaties hiervan) voor embryonale sterfte zorgen na inoculatie in kippenembryo's van 18 dagen leeftijd. De selectie van bacteriën is gebaseerd op resultaten van een veldstudie en van een embryo letaliteit assay (ELA).

Uit verschillende andere studies blijkt dat combinaties van [REDACTED] ook veelvuldig wordt aangetroffen in niet uitgekomen eieren en kuikens die in de eerste levensweek zijn gestorven (Olsen *et al.*, 2012, Karunarathna *et al.*, 2017, Walker *et al.*, 2020). Daarnaast werd aangetoond dat *E. faecalis* de ernst van colibacillose, een infectie die veel voorkomt bij kuikens, kan verergeren (Walker *et al.*, 2020).

Door middel van de ELA kan de virulentie van de bacteriën worden ingeschat. Op basis van de resultaten van de ELA zullen de bacteriën voor de dierexperimenten worden geselecteerd. Hierbij zal ook een combinatie van

meerdere bacteriesoorten worden geïnoculeerd om een mogelijke synergetisch effect te toetsen. Uit onderzoek van Walker *et al.* (2022) blijkt dat een combinatie van *E. faecalis* en *E. coli* zorgt voor meer embryonale sterfte (inoculatie op dag 12) in vergelijking met inoculatie van alleen *E. faecalis* of *E. coli*. In de veldstudie werden uit gestorven geëmbryoneerde eieren ook de combinatie van *E. faecalis* en *E. coli* aangetoond.

In het experiment zullen maximaal 9 verschillende inocula gebruikt worden waarmee de groepen eieren worden geïnjecteerd. Deze inocula bestaan uit:



9. Steriel fysiologisch zout 0.1 ml (controle)

Indien op basis van ELA geen verschil gemaakt kan worden tussen virulent en hoog virulente *E. coli* of *E. faecalis* isolaten zullen de desbetreffende groepen komen te vervallen.

In totaal zullen 8 verschillende groepen eieren worden geïnoculeerd en [redacted] worden geïnoculeerd. KVE staat voor kolonievormende eenheden. Bij deze concentratie kan bij virulente bacteriën (in het geval van de *E. cecorum* bacterie) een verhoogde embryonale sterfte worden waargenomen (Arango *et al.*, 2023).

Onderzoekparameters:

Vanaf dag 19,5 van het broedproces wordt iedere 4 uur gekeken hoeveel kuikens uit het ei gekomen zijn. Bij uitkomst worden de volgende parameters per experimentele groep beoordeeld:

- Aantal levensvatbare kuikens
 - o Van alle levensvatbare kuikens wordt TONA score bepaald (kwalitatieve parameter voor kuikenkwaliteit) (Tona *et al.*, 2003).
 - o Van alle levensvatbare kuikens wordt de lengte gemeten (kwantitatieve parameter voor kuikenkwaliteit).
 - o Van alle levensvatbare kuikens wordt het gewicht bepaald.
- Aantal niet levensvatbare kuikens*
 - o Alle kuikens die niet zelfstandig kunnen eten en drinken en/of later dood gaan aan congenitale afwijkingen (niet levensvatbare kuikens) worden gedood. Dit zijn o.a. kuikens met open abdomens, niet goed ontwikkelde snavels (kruissnavels), etc.
- Aantal niet uitgekomen eieren
 - o Macroscopisch, bacteriologisch en histologisch onderzoek wordt uitgevoerd op niet uitgekomen embryo's.

*Niet levensvatbare kuikens worden in commerciële broederijen ook geselecteerd en gedood. Het percentage niet levensvatbare kuikens is normaal 0,2-0,5%.

Uitgekomen en levensvatbare kuikens worden per experimentele groep in grondhuisvesting geplaatst en gehouden tot een leeftijd van 7 dagen.

De volgende parameters worden per experimentele groep onderzocht.

- Aantal kuikens dat gedood wordt of sterft in de eerste levensweek.
 - o Macroscopisch en bacteriologisch onderzoek wordt uitgevoerd op gestorven kuikens.
- Kuikengewicht op dag 7 wordt bepaald.
- Einde experiment worden kuikens gedood
 - o Macroscopisch, bacteriologisch en histologisch onderzoek wordt uitgevoerd op gedood kuikens.

Go- no go moment (3):

- Wanneer er in de negatieve controle groep (broedeieren zonder inoculatie) een hoge embryonale sterfte (>20-10%) wordt waargenomen, wijkt dit ver af van de verwachting (2-3% embryonale sterfte).

Het is aannemelijk dat er tijdens het broedproces iets is misgegaan wat de resultaten van het onderzoek kan beïnvloeden. **Of als er aanwijzingen zijn voor een infecties van de embryo's tijdens macroscopisch en bacteriologisch onderzoek**, Er zal er niet verder gegaan worden met de overige experimenten. Het broedproces wordt geanalyseerd en experiment 1 zal herhaald worden.

Go-no go moment (4):

- Wanneer er geen verschil in embryosterfte aangetoond wordt tussen de experimentele groepen en de controle groep zullen de overige experimenten niet worden uitgevoerd.

Dierproef 2:

Het doel van experiment 2 is om te bepalen of de hoeveelheid bacteriën invloed heeft op de tijd tot het moment van sterfte, zowel embryonale sterfte als sterfte in de eerste levensweek.

Uit eerder onderzoek naar *E. coli* infecties bij leghennen bleek dat wanneer de dieren met een lagere concentratie bacteriën werden geïnfecteerd het sterfte percentage gelijk bleef of minimaal afnam, maar dat de tijd tot het moment van sterfte toenam (Landman *et al.*, 2021). Indien in dit experiment lagere concentraties worden gebruikt kan het moment van sterfte verplaatsen van de broederij (embryonale sterfte) naar het vleeskuikenbedrijf (sterfte in de eerste levensweek). In dit experiment willen we kijken bij welke dosis zowel de embryonale sterfte als de sterfte in de eerste levensweek sterk afneemt. De te nemen effectieve preventieve maatregelen dienen de bacteriële contaminatie zo ver te verminderen dat zowel de embryonale sterfte als de sterfte in de eerste levensweek doet afnemen.

Hiervoor worden de twee bacterie-isolaten (of combinatie van bacteriën) die in experiment 1 voor de meeste embryonale sterfte zorgden geselecteerd en in verschillende doseringen in broedeieren geïnoculeerd.

De geselecteerde bacteriën worden geïnoculeerd in [REDACTED] in geëmbryoneerde kippeneieren.

Daarna wordt volgens standaardprocedures het broedproces vervolgd.

Onderzoekparameters:

Vanaf incubatie dag 19.5 wordt iedere 4 uur gekeken hoeveel kuikens uitgekomen zijn. Bij uitkomst worden de volgende parameters per experimentele groep beoordeeld:

- Aantal levensvatbare kuikens
 - o Van alle levensvatbare kuikens wordt TONA score bepaald (kwalitatieve parameter voor kuikenkwaliteit).
 - o Van alle levensvatbare kuikens wordt de lengte gemeten (kwantitatieve parameter voor kuikenkwaliteit).
 - o Van alle levensvatbare kuikens wordt het gewicht bepaald.
- Aantal niet levensvatbare kuikens
 - o Niet levensvatbare kuikens worden gedood, dit zijn o.a. kuikens met open abdomen, niet goed ontwikkelde snavels (kruissnavels), etc.
- Aantal niet uitgekomen eieren
 - o Macroscopisch, bacteriologisch en histologisch onderzoek wordt uitgevoerd op niet uitgekomen embryo's.

Uitgekomen kuikens worden per experimentele groep in grondhuisvesting geplaatst en gehouden tot een leeftijd van 7 dagen.

De volgende parameters worden per experimentele groep onderzocht.

- Aantal kuikens dat gedood wordt of sterft in de eerste levensweek.
 - o Macroscopisch en bacteriologisch onderzoek wordt uitgevoerd op gestorven kuikens.
- Kuikengewicht op dag 7 wordt bepaald.
- Einde experiment worden alle kuikens gedood.
 - o Macroscopisch, bacteriologisch en histologisch onderzoek wordt uitgevoerd op gedode kuikens.

Dierproef 3:

Het doel van experiment 3 is om te bepalen of de verminderde uitkomst van de broedeieren afhankelijk is van de plaats van inoculatie in het geëmbryoneerde kippenei.

Dezelfde bacterie-isolaten (of combinaties van bacterie-isolaten) die in experiment 2 werden gebruikt worden in experiment 3 in verschillen compartimenten van het geëmbryoneerde kippenei ingebracht. De hoeveelheid

bacteriën die geïnoculeerd zullen worden is [REDACTED] Indien uit experiment 2 blijkt dat er veel meer embryo's sterven dan verwacht, zal de inoculatie doses in experiment 3 worden verlaagd.

De experimentele groepen (7) zijn als volgt opgedeeld:

- Negatieve controle groep (broedeieren zonder injectie)

Injectie fysiologisch zout in:

- Amnion holte
- Embryo

Injectie met bacterie A in:

- Amnion holte
- Embryo

Injectie met bacterie B:

- Amnion holte
- Embryo

Na inoculatie wordt volgens standaard procedure het broedproces vervolgd.

Onderzoekparameters:

Vanaf incubatie dag 19,5 wordt iedere 4 uur gekeken hoeveel kuikens uitgekomen zijn. Bij uitkomst worden de volgende parameters per experimentele groep beoordeeld:

- Aantal levensvatbare kuikens
 - o Van alle levensvatbare kuikens wordt TONA score bepaald (kwalitatieve parameter voor kuikenkwaliteit).
 - o Van alle levensvatbare kuikens wordt de lengte gemeten (kwantitatieve parameter voor kuikenkwaliteit).
 - o Van alle levensvatbare kuikens wordt het gewicht bepaald.
- Aantal niet levensvatbare kuikens
 - o Niet levensvatbare kuikens worden gedood. Dit zijn o.a. kuikens met open abdomen, niet goed ontwikkelde snavels (kruissnavels), etc.
- Aantal niet uitgekomen eieren
 - o Macroscopisch, bacteriologisch en histologisch onderzoek wordt uitgevoerd op niet uitgekomen embryo's.

Uitgekomen kuikens worden per experimentele groep in grondhuisvesting geplaatst en gehouden tot een leeftijd van 7 dagen.

De volgende parameters worden per experimentele groep onderzocht.

- Aantal kuikens dat gedood wordt of sterft in de eerste levensweek.
 - o Macroscopisch en bacteriologisch onderzoek wordt uitgevoerd op gestorven kuikens.
- Kuikengewicht op dag 7 wordt bepaald.
- Einde experiment worden alle kuikens gedood.

Macroscopisch en bacteriologisch onderzoek wordt uitgevoerd op gedode en gestorven kuikens.

Dierproef 4

Het doel van het 4^{de} experiment is om te bepalen of transmissie van bacteriën plaatsvindt tussen besmette eieren (of delen daarvan) doormiddel van een in ovo apparaat naar de daaropvolgend gevaccineerde embryo's. Daarnaast wordt gekeken of deze transmissie ook leidt tot verhoogde embryonale sterfte en/of sterfte in de eerste levensweek.

Hiervoor worden verschillende onderdelen van de in ovo vaccinatie machine of geëmbryoneerde eieren geïnoculeerd, zie figuur 1 t/m 4. Met deze informatie wordt inzichtelijk op welke plekken de transmissie van bacteriën het meest effectief is en waar in het vaccinatie proces specifieke maatregelen genomen kunnen worden om deze transmissie te voorkomen.

In dit experiment wordt een commercieel in ovo vaccinatie apparaat gebruikt om meerdere broedeieren op dag 18 opeenvolgend te injecteren. De bacteriële contaminatie vindt plaats bij vaccinatie van het eerste ei (ei 0). Hierna worden een aantal eieren (maximaal 3) opeenvolgend geïnjecteerd met een in ovo vaccinatie machine

om het normaal proces van in ovo vaccinatie na te bootsen. Op basis van de in vitro studie zal duidelijk worden of transmissie op kan treden en ik welke mate transmissie voor komt in vitro. Deze informatie zal worden gebruikt om het aantal eieren dat opeenvolgend geïnjecteerd zal worden te bepalen. In totaal zullen maximaal 4 eieren worden geïnjecteerd met bacteriën, het initieel gecontamineerd ei (ei 0) en 3 daaropvolgend geïnjecteerde eieren.

De verschillende contaminatie plekken zijn als volgt:



Één bacterie-isolaat zal gebruikt worden en wordt geselecteerd op basis van de resultaten van experiment 1 t/m 3. Op de verschillende locaties zullen [redacted] van de bacterie worden geïnoculeerd.

Na injectie wordt het broedproces hervat.

Onderzoekparameters:

Vanaf incubatie dag 19.5 wordt iedere 4 uur gekeken hoeveel kuikens uitgekomen zijn. Bij uitkomst worden de volgende parameters per experimentele groep beoordeeld:

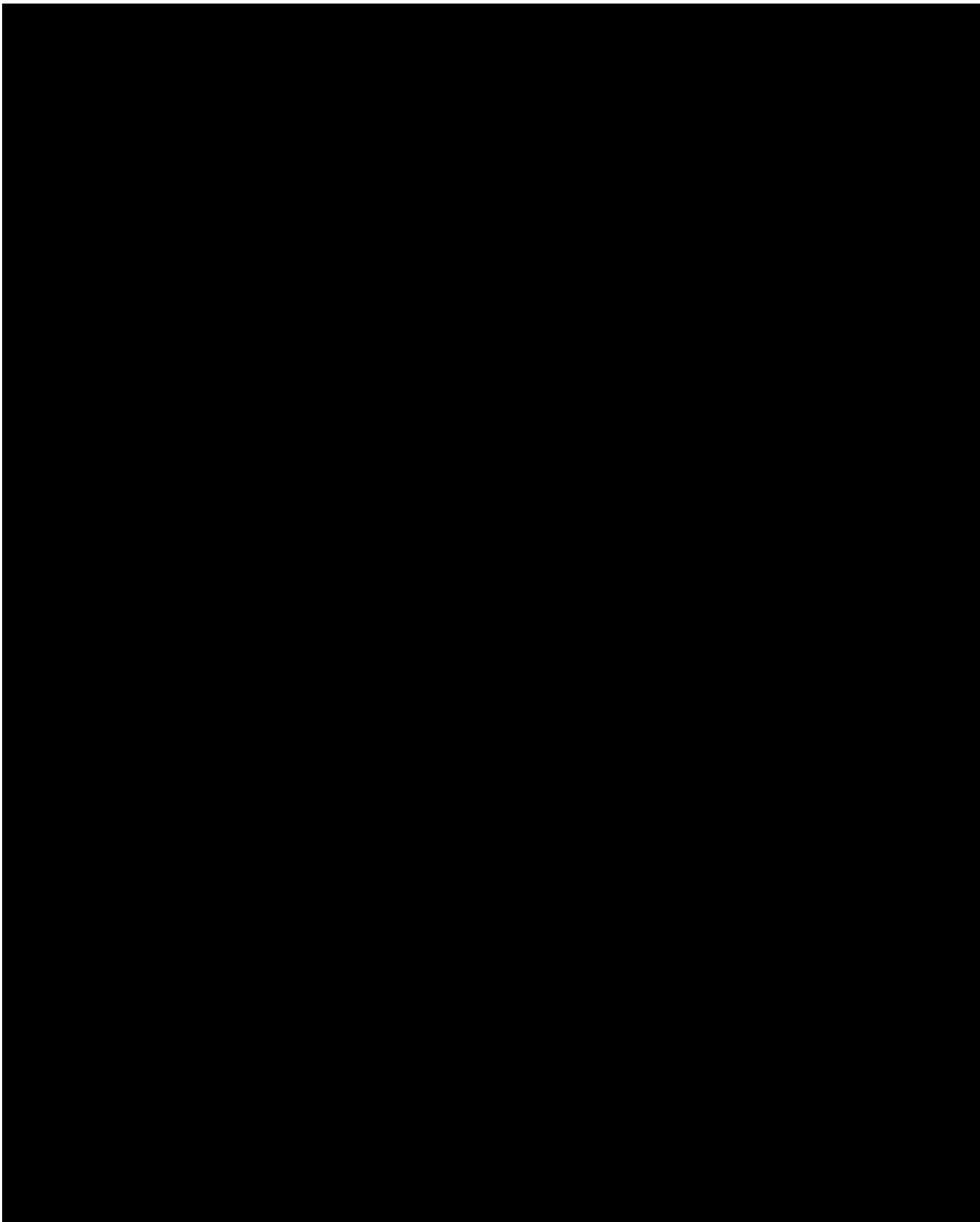
- Aantal levensvatbare kuikens
 - o Van alle levensvatbare kuikens wordt TONA score bepaald (kwalitatieve parameter voor kuikenkwaliteit).
 - o Van alle levensvatbare kuikens wordt de lengte gemeten (kwantitatieve parameter voor kuikenkwaliteit).
 - o Van alle levensvatbare kuikens wordt het gewicht bepaald.
- Aantal niet levensvatbare kuikens
 - o Niet levensvatbare kuikens worden gedood. Dit zijn o.a. kuikens met open abdomens, niet goed ontwikkelde snavels (kruissnavels), etc.
- Aantal niet uitgekomen eieren
 - o Macroscopisch, bacteriologisch en histologisch onderzoek wordt uitgevoerd op niet uitgekomen embryo's.

Wanneer er uit de resultaten van experiment 1 en 2 blijkt dat de resultaten verzameld van de kuikens in de eerste levensweek (zoals hieronder vermeld) geen toegevoegde waarde hebben zal er besloten worden de kuikens na uitkomst direct te doden. Indien er geen sterfte bij kuikens in de eerste levensweek wordt waargenomen of de embryonale sterfte een goede voorspeller is voor de sterfte in de eerste levensweek, zal er in experiment 3 en 4 alleen naar embryonale sterfte gekeken worden.

Uitgekomen kuikens worden per experimentele groep in grondhuisvesting geplaatst en gehouden tot een leeftijd van 7 dagen.

De volgende parameters worden per experimentele groep onderzocht.

- Aantal kuikens dat gedood wordt of sterft in de eerste levensweek.
 - o Macroscopisch en bacteriologisch onderzoek wordt uitgevoerd op gedode en gestorven kuikens.
- Kuikengewicht op dag 7 wordt bepaald.
- Einde experiment worden alle kuikens gedood.
 - o Macroscopisch, bacteriologisch en histologisch onderzoek wordt uitgevoerd op gedode kuikens.



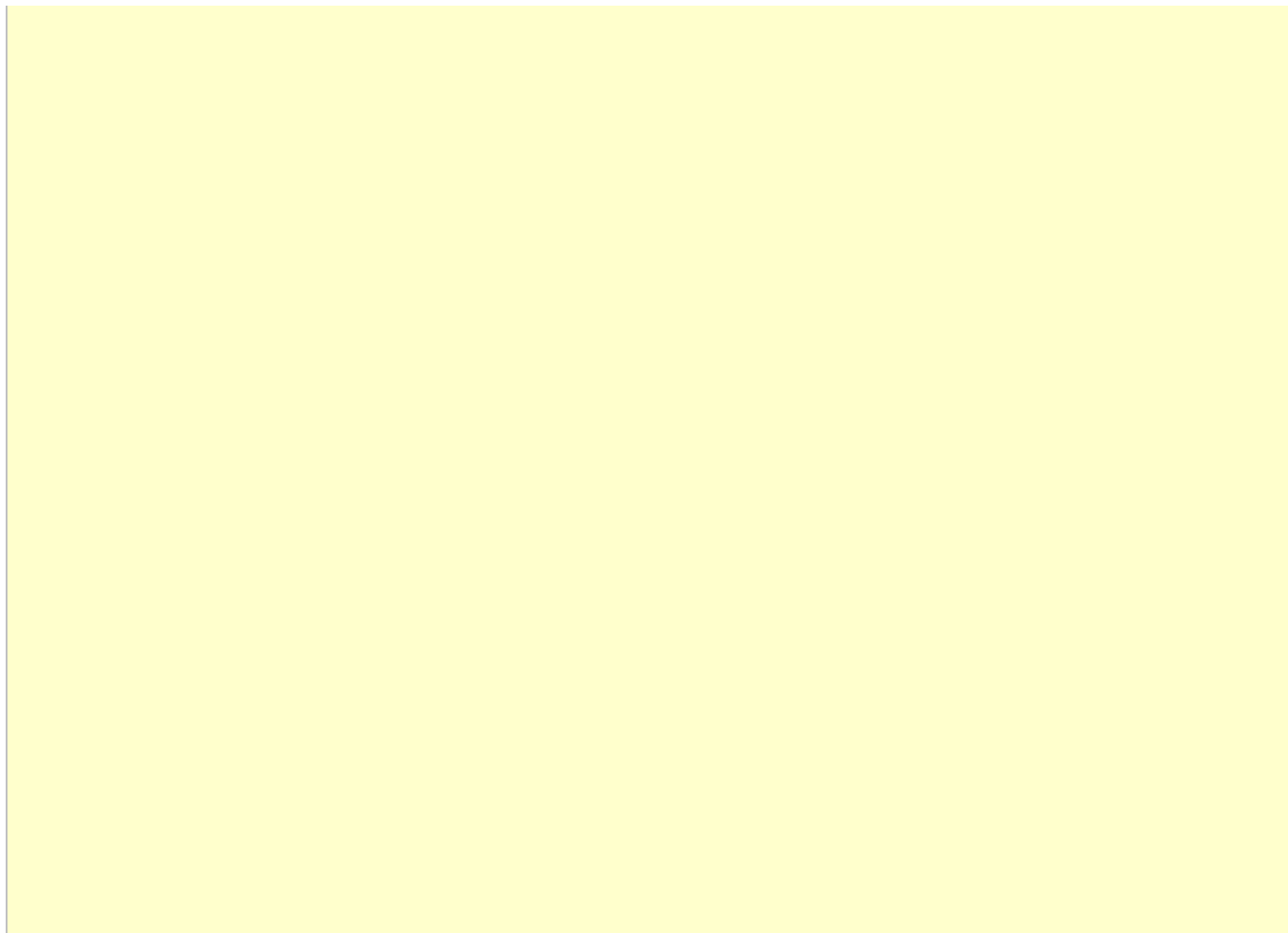
3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

Er is gekozen voor een opeenvolging van in vitro studies en dierexperimenten omdat dit zorgt voor een vermindering van het aantal proefdieren. Door een goede veldstudie uit te voeren in combinatie met een embryo letaliteit assay is er een grote kans dat bacteriën worden geselecteerd die het oorzakelijk agens zijn embryonale sterfte na in ovo vaccinatie. In experiment 2 en 3 worden slechts twee experimentele groepen gebruikt welke zijn geselecteerd op basis van experiment 1. Hierdoor zal het aantal proefdieren voor deze experimenten verminderen.

Er zijn een aantal go/no go momenten verwerkt in de strategie. Hieronder een onderbouwing van de in 3.4.1 genummerde go/no go momenten.

- (1) Voorafgaand aan de dierproeven zal er een in vitro studie uitgevoerd worden om te voorkomen dat er überhaupt geen bacteriële transmissie plaatsvindt doormiddel van de naalden die gebruikt worden voor in ovo vaccinatie.
- (2) Het tweede go/no go moment is voorafgaand aan de dierproeven. Wanneer er uit embryo letaliteit assays en in vitro transmissie studie blijkt dat de veldmonsters niet voor embryosterfte zorgen en transmissie zorgen, is er geen reden om de dierexperimenten uit te voeren. Er zullen dan nieuwe isolaten uit het veld verzameld moeten worden.
- (3) Wanneer er in de negatieve controle groep (broedeieren zonder inoculatie) een hoge embryonale sterfte (>20%) wordt waargenomen, wijkt dit ver af van de verwachting (3-4% embryonale sterfte). Het is aannemelijk dat er tijdens het broedproces iets is misgegaan wat de resultaten van het onderzoek kan beïnvloeden. Er zal niet verder gegaan worden met de overige experimenten, het broedproces wordt geanalyseerd en experiment 1 zal herhaald moeten worden.
- (4) Na experiment 1 zal er gekeken worden hoeveel isolaten er voor een verhoogde embryonale sterfte zorgen. Deze stap is essentieel omdat de ELA een ander inoculatie moment hebben dan dat er in het veld gebeurt bij in ovo vaccinatie. Embryo's van 18 dagen oud hebben een beter ontwikkeld immuunapparaat dan embryo's van 12 dagen oud. De resultaten uit de ELA zullen mogelijk niet corresponderen met de resultaten van de dierexperimenten. In experiment 1 wordt gekeken welke bacteriën een effect hebben op de embryonale sterfte, indien hier effect waar te nemen is kunnen isolaten geselecteerd worden voor experiment 2 en 3. Wanneer blijkt dat geen enkel bacterie isolaat zorgt voor embryonale sterfte of sterfte in de eerste levensweek zullen de daaropvolgende experimenten niet worden uitgevoerd.

Experiment 4 borduurt voort op resultaten van de voorgaande experimenten. In deze studie wordt het effect van bacteriële contaminatie op verschillende onderdelen van de in ovo machine getest. Dit laatste experiment zal veel inzicht geven hoe bacteriële contaminatie kan optreden en waar specifieke preventieve maatregelen genomen kunnen worden.



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

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Bacteriële contaminatie van in ovo toegediende vaccinaties
2	Click or tap here to enter text.
3	
4	Click or tap here to enter text.
5	Click or tap here to enter text.
6	Click or tap here to enter text.
7	Click or tap here to enter text.
8	Click or tap here to enter text.
9	Click or tap here to enter text.
10	Click or tap here to enter text.



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 on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10800	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Utrecht University	
1.3 List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	001	Bacteriële contaminatie van in ovo toegediende vaccinaties

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.

Er zullen in totaal 4 verschillende dierproeven worden uitgevoerd. De uitleesparameters en handelingen die nodig zijn voor alle dierproeven worden hier eerst besproken waarna per dierproef specifieke handelingen worden uitgelegd.

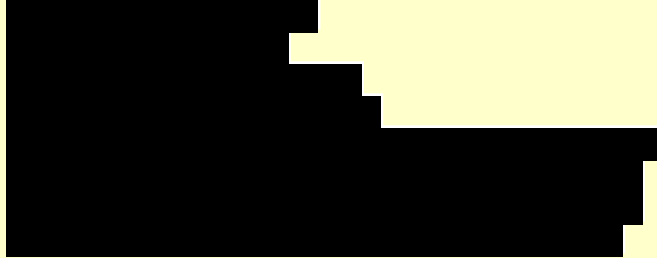
De vier dierproeven zijn:

1. Inoculatie broedeieren met verschillende bacteriën
2. Inoculatie broedeieren met verschillende concentraties van bacteriën
3. Inoculatie broedeieren in de verschillende compartimenten van het geëmbryoneerde kippenei.
4. Contaminatie van verschillende onderdelen van de in ovo vaccinatie machine

Dierproef 1:

In dit experiment worden 18 dagen bebroede eieren geïnjecteerd met vier verschillende bacterie-isolaten en met combinaties van 2 bacteriesoorten. De 4 soorten bacteriën zijn geselecteerd in een veldstudie waarin is gekeken welke bacterie-isolaten een rol spelen in embryonale sterfte na in ovo vaccinatie.

De volgende bacteriën en combinaties van bacteriën zullen worden geïnoculeerd in deze dierproef:



9. Steriel fysiologisch zout 0.1 ml (controle)

*Classificatie van virulentie is gebaseerd op de uitvoering van een ELA. Enkel virulent (+) en zeer virulente (++) isolaten worden geselecteerd.

Dierproef 2:

In dit experiment worden 18 dagen bebroede eieren geïnjecteerd met twee verschillende bacterie-isolaten (of combinaties van deze bacterie-isolaten) [redacted] doseringen. De twee meest virulente bacteriën (of combinatie van bacteriesoorten) zijn geselecteerd op basis van de resultaten van experiment één.

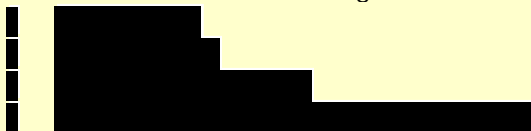
Dierproef 3:

In dit experiment worden 18 dagen bebroede eieren geïnjecteerd met twee verschillende bacterie-isolaten of combinaties van deze bacterie-isolaten. Deze bacterie-isolaten zijn geselecteerd op basis van de resultaten van experiment één. De bacteriën worden in twee verschillende compartimenten van geëmbryoneerde kippeneieren geïnoculeerd, namelijk in de amnionholte en in het embryo. Het merendeel van de in ovo vaccinaties komt namelijk terecht in de amnionholte van het geëmbryoneerde ei, een kleiner deel van komt in het embryo. In deze proef willen we onderzoeken of de locatie van contaminatie effect heeft op de embryonale sterfte en sterfte in de eerste levensweek.

Dierproef 4:

In dit experiment worden 18 dagen bebroede eieren in ovo geïnjecteerd door middel van een in ovo vaccinatie machine. De transmissie van bacteriën naar daaropvolgend geïnjecteerde geëmbryoneerde eieren zal worden onderzocht. Voor de injectie van het eerste ei worden verschillende onderdelen van de geëmbryoneerde eieren of het in ovo vaccinatie apparaat gecontamineerd. De daaropvolgende eieren worden geïnjecteerd met dezelfde naalden, hiermee willen we toetsen of, en in welke mate, er overdracht plaatsvindt van bacteriën. Een in ovo vaccinatie machine werkt als volgt in het kort: met een zogenaamde "punch" naald wordt er aan de bolle kant van het ei een gat in de eischaal gemaakt. Onder deze bolle kant bevindt zich de luchtkamer. Vervolgens wordt er met een naald met een kleinere diameter (injectienaald) door het gat in de eischaal door de luchtkamer heen het vaccin in het vruchtwater (amnionvloeistof) of in het embryo zelf geïnjecteerd. Zowel de "punch" naalden als de injectienaalden worden gebruikt voor het vaccineren van meerdere opeenvolgende eieren.

De verschillende onderdelen die gecontamineerd worden zijn:



De verschillende onderdelen worden alleen gecontamineerd en gebruikt in de dierproef indien er in de in vitro studie (voorafgaand aan deze dierproef uitgevoerd) transmissie is aangetoond.

In dierproef 1 en 2 worden geëmbryoneerde eieren op dag 18 van het broedproces handmatig geïnoculeerd zoals is beschreven in het werk van Manders *et al.*, (2022). Hierbij komt het inoculum in de amnion vloeistof of het embryo terecht. Deze methode komt overeen met het machinaal vaccineren van geëmbryoneerde eieren. In dierproef 3 worden de geëmbryoneerde eieren gericht geïnoculeerd in de amnion holte of het embryo, deze

inoculatie methode is beschreven door Wakenell et al. (2002). In dierproef 4 zullen de geëmbryoneerde eieren machinaal worden geïnoculeerd.

In alle dierproeven worden de eieren na inoculatie teruggeplaatst in de broedmachine om het broedproces te voltooien.

Na uitkomst van de kuikens worden de volgende resultaten verzameld:

- Embryonale sterfte
- Hatch window
- Kuikenkwaliteit
- Overlevingspercentage eerste week
- Lichaamsgewicht op dag 7
- Macroscopisch, bacteriologisch en histologische onderzoek van organen uit gestorven en gedode embryo's en kuikens.

Verantwoording parameters:

In ovo vaccinatie is een vaccinatie methode die steeds meer wordt toegepast in broederijen wereldwijd. Tijdens deze vaccinatie wordt een naald in het ei gebracht waardoor er een natuurlijke barrière wordt doorbroken. Er bestaat een risico dat tijdens deze procedure bacteriële contaminatie in het ei ontstaat. In het veld wordt deze contaminatie dan ook geregeld waargenomen.

Een verdenking op bacteriële contaminatie is gebaseerd op een verhoogd percentage embryonale sterfte van de broedeieren al dan niet in combinatie met een verminderd overlevingspercentage in de eerste levensweek. Deze verdenking kan door middel van bacteriologisch onderzoek worden bevestigd.

Een verhoogd percentage embryonale sterfte zal in deze studie de belangrijkste parameter zijn. Daarnaast willen we het overlevingspercentage in de eerste levensweek bepalen. De hoeveelheid bacteriën kan invloed hebben op de tijd tot het moment van sterfte. Een lagere dosering bacteriën kan leiden tot hetzelfde sterftepercentage, maar de tijd tot het moment van sterfte kan verlengd zijn. Omdat de tijd tussen contaminatie in het ei en uitkomst van het ei kort is, zou een lagere hoeveelheid bacteriën kunnen leiden tot sterfte in de eerste levensweek in plaats van embryonale sterfte. Om het effect van bacteriële infectie bij de pas uitgekomen kuikens te onderzoeken wordt de kuikenkwaliteit bepaald. De verwachting is dat deze zal zijn aangedaan bij een bacteriële infectie.

Naast een verhoogde embryonale sterfte (die in het veld wordt gerapporteerd) kan een bacteriële infectie mogelijk zorgen voor een verlengde periode van uitkomst (hatch window). Dit is de tijd tussen het eerste kuiken dat uit het ei komt en het laatste kuiken dat uit het ei komt. Een verlengde hatch window is ongewenst omdat de kuikens op de broederij maar op één moment uit de broedmachine worden gehaald. Dit zogeheten afrapen van de kuikens wordt op een moment gedaan dat de meeste kuikens uitgekomen zijn. Wanneer het hatch window verlengd is zullen kuikens die erg vroeg uit het ei gekomen zijn lange tijd in de broedmachine bij een suboptimaal klimaat (omgevingstemperatuur en luchtvochtigheid) verblijven. Dit is vaak ook zonder toegang tot voer en water.

In deze studie willen we uit het ei gekomen kuikens vanaf embryo dag 19,5 (468 uur na de start van het broedproces) iedere 4 uur uit de broedmachine verwijderen, zodat het hatch window bepaald kan worden.

Het is mogelijk dat de bacteriële contaminatie niet voor een verhoogde embryonale sterfte zorgt, maar wel de kuikenkwaliteit vermindert. Kuikenkwaliteit is een term die in broederijen en bij pluimveehouders vaak wordt gebruikt om te verwijzen naar de gezondheid en vitaliteit van kuikens. Een goede kuikenkwaliteit betekent dat de kuikens een goede ontwikkeling hebben doorgemaakt gedurende het broedproces, gezond en vitaal zijn en daarmee een grote overlevingskans hebben en waarschijnlijk een goed groeipotentieel hebben.

Het bepalen van de kuikenkwaliteit kan kwalitatief (door onder andere het scoren van de mate van activiteit en de navel) en kwantitatief (zoals kuikenlengte). In de dierproeven willen we de kuikenkwaliteit bepalen door de kuikenlengte bij uitkomst (kwantitatieve score) te meten (Molenaar et al., 2008). Daarnaast wordt de Tona score bepaald (kwalitatieve score) (Tona *et al.*, 2003). Kuikenlengte en Tona score zijn betrouwbare parameters om kuiken kwaliteit te bepalen. De Tona score is te vergelijken met de Apgarscore die na de geboorte van een pasgeboren baby wordt vastgesteld om een indruk van de algemene toestand van een neonaat te krijgen. Bij het uitvoeren van de Tona score worden kuikens gehanteerd en wordt de volgende aspecten beoordeeld: activiteit, donsveren, opname van de dooier, ogen, poten, navel en eventueel membranen die nog aanwezig

zijn. Om de kuikenlengte te bepalen wordt een kuiken volledig gestrekt en de lengte van de snavel tot aan de teen gemeten.

Kuikenkwaliteit wordt beoordeeld volgens de methode beschreven in: Molenaar et al., 2008 en Tona et al., 2003. Een gevolg van een verminderde kuikenkwaliteit kan verhoogde sterfte in de eerste levensweek zijn en een verminderde groei en welzijn tot gevolg hebben.

Naast een verhoogd percentage embryonale sterfte na bacteriële contaminatie wordt ook vaak een verhoogde sterfte in de eerste levensweek gerapporteerd. Om deze reden is er gekozen om in dit eerste experiment te kijken naar de totale sterfte door bacteriële contaminatie van dag -3 (dag 18 van het embryo) tot dag 7 (7 dagen na uitkomst).

Van embryo's die sterven zullen verschillende organen worden verzameld voor macroscopisch en histologisch onderzoek. Het doel van het histologisch onderzoek is om een indicatie te krijgen welke pathofysiologische processen ten grondslag liggen aan de embryonale sterfte. Er zullen monsters genomen worden van extra-embryonale vliezen (chorio-allantoïsmembraan en dooierzak), long, darmen, lever en milt.

Een kippenembryo is voor gasuitwisseling (zuurstof en kooldioxide) afhankelijk van het chorio-allantoïsmembraan. Dit verandert pas wanneer het kuiken de luchtkamer aanprijkt en gaat ademen. Het aanprikken van de luchtkamer vindt plaats wanneer het embryo ongeveer 19,5 dag oud is. Mogelijk kunnen bacteriën extra-embryonale vliezen aantasten wat de dood van embryo's tot gevolg kan hebben.

Amnion vloeistof wordt oraal opgenomen door kuikens en deze vloeistof kan terecht komen in het maagdarmkanaal maar ook in het respiratieapparaat. Monsters zullen daarom genomen worden van longen en het eerste deel van de darmen. Indien bacteriën systemische infecties veroorzaken in embryo's verwachten wij dit terug te zien in lever en milt.

Dierproef 2:

In deze dierproef willen we kijken of de hoeveelheid bacteriën effect heeft op de tijd tot het moment van sterfte. Bij lage concentraties is het mogelijk dat de embryonale sterfte lager wordt terwijl de sterfte in de eerste levensweek zal toenemen, de tijd tussen inoculeren en het optreden van sterfte is dan langer. Bij *E. coli* inoculaties in leggende hennen is bekend dat wanneer de concentratie van bacteriën afneemt de mean death time (tijd tot sterfte) toeneemt (Landman *et al.*, 2022). In deze dierproef willen we onderzoeken of dit effect ook waar te nemen is bij inoculaties van geëmbryoneerde kippeneieren.

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

Broedeieren, afkomstig van een commercieel vleeskuikenouderdierenbedrijf, zonder een historie van klinische problemen door [REDACTED] worden in broedkasten geplaatst en uitgebroed volgens een standaard broedprotocol.

Op dag 18 worden alle eieren geschouwd. Schouwen doet men door een lamp op het ei te plaatsen en te kijken of er een levend embryo in het ei aanwezig is. Alle eieren die geen levend embryo bevatten worden verwijderd. Hierna worden alle eieren random over de verschillende groepen verdeeld.

Op dag 18 van het broedproces, worden de geëmbryoneerde eieren éénmalig geïnoculeerd met bacterie-isolaten. In de verschillende dierproeven wordt een inoculatie techniek gebruikt die vergelijkbaar of hetzelfde is met de procedures die worden toegepast om geëmbryoneerde eieren machinaal in ovo te vaccineren.

Vanaf incubatie dag 19,5 wordt iedere vier uur gekeken hoeveel kuikens uitgekomen zijn. Bij uitkomst worden de volgende parameters per experimentele groep beoordeeld:

- Aantal levensvatbare kuikens
 - o Van alle levensvatbare kuikens wordt de Tona score¹ bepaald (kwalitatieve parameter voor kuikenkwaliteit).
 - o Van alle levensvatbare kuikens wordt de lengte gemeten² (kwantitatieve parameter voor kuikenkwaliteit).
 - o Van alle levensvatbare kuikens wordt het gewicht bepaald.
- Aantal niet levensvatbare kuikens
 - o Niet levensvatbare kuikens worden gedood³, dit zijn o.a. kuikens met open abdomen, niet goed ontwikkelde snavels (kruissnavels), etc.

- Aantal niet uitgekomen eieren
 - o Macroscopisch, bacteriologisch en histologisch onderzoek wordt uitgevoerd op niet uitgekomen embryo's.

¹Bij het uitvoeren van de Tona score worden kuikens gehanteerd en worden de volgende parameters beoordeeld: activiteit, donsveren, opname van de dooier, ogen, poten, navel en eventueel membranen die nog aanwezig zijn.

²Om de kuikenlengte te bepalen wordt een kuiken volledig gestrekt en de lengte van de snavel tot aan de teen gemeten.

³Naar schatting zal dit minder dan 0.5% van de kuikens betreffen.

Uitgekomen kuikens worden per experimentele groep in grondhuisvesting geplaatst en gehouden tot een leeftijd van 7 dagen.

De volgende parameters worden per experimentele groep onderzocht.

- Aantal kuikens dat gedood wordt of sterft in de eerste levensweek.
 - o Macroscopisch en bacteriologisch onderzoek wordt uitgevoerd op gestorven kuikens.
- Kuikengewicht op dag 7 wordt bepaald.
- Einde experiment (dag 7) worden kuikens gedood
 - o Macroscopisch, bacteriologisch en histologisch onderzoek wordt uitgevoerd op gedode kuikens.

Doden van kuikens in de eerste levensweek:

Alle dieren worden elke 6 uur op afstand geobserveerd. Van alle kuikens die spontaan sterven wordt de sterfte genoteerd. Om het ongerief bij de kuikens zo klein mogelijk te houden zullen de kuikens, die de eerste signalen vertonen die wijzen op de aanstaande dood, gedood worden. Volgens onderzoek van Matthijs *et al.* (2017) naar "signs of imminent death" is het mogelijk om kuikens waarvan men (met grote zekerheid) kan zeggen dat de dood nabij is, uit de proef te halen zonder de onderzoeksresultaten te beïnvloeden. Deze kuikens kunnen worden meegeteld in de categorie van kuikens die spontaan sterven. Op basis van deze criteria zullen kuikens die voldoen aan onderstaande criteria vroegtijdig uit het onderzoek worden gehaald.

Het uitvoeren van het onderzoek zal als volgt plaatsvinden:

Alle dieren worden elke 6 uur individueel, op korte afstand geobserveerd. Dieren die signalen van algehele malaise (definitie zie hieronder) vertonen zullen direct gedood worden omdat we verwachten dat deze kuikens met grote zekerheid dood gaan.

Elke kuiken dat een score van 2 of hoger haalt (volgens het systeem wat hieronder gedefinieerd en gevalideerd is in de studie van Matthijs *et al.* (2017)) zal direct worden gedood.

Kuikens die in twee observatiemomenten op rij een score van 1 halen zullen direct na het tweede observatie moment gedood worden.

Aanwezigheid van signalen van algehele malaise (ziekte) waarbij de dood volgt zijn als volgt gedefinieerd:

- Mate van bewustzijn
 - 0) Kuiken reageert op een harde klap van de handen op elkaar door het één oog te draaien in de richting van het geluid (opkijken)
 - 1) Vogel reageert niet op een harde klap van de handen op elkaar, maar reageert wel op zachte aanraking (met een vinger) in het midden van de vleugel. De vogel blijft zelf staan en valt niet om door deze aanraking
 - 2) Vogel reageert niet op de handklap of aanraking.
- Houding en gang
 - 0) Normale houding. Hoofd, vleugel en staart* wijzen lichtelijk omhoog, wijzende op de spierspanning nodig voor het ondersteunen van het hoofd, de vleugels en de staart. Ogen zijn geopend.
 - 1) Vogel heeft normale houding (zoals hierboven beschreven) maar de ogen zijn gesloten.
 - 2) Vogel zit "bol" met hangende staart en vleugels, teruggetrokken nek, rommelig dons- en verenkleed maar ogen open.
 - 3) Vogel zit "bol" met hangende staart en vleugels, teruggetrokken nek, rommelig dons- en verenkleed en gesloten ogen.

*De staart van een eendagskuiken is klein en mogelijk lastig te beoordelen. Staart en vleugelveren beginnen op de eerste dag te groeien en zijn duidelijk waarneembaar als vleugel- en staartveren op het einde van de eerste week. Door deze groei van veren is de stand van de staart al snel te beoordelen. De normale houding van de dieren kan op basis van de houding van de vleugels en het hoofd worden beoordeeld.

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

Dierproef 1:

Om het aantal te gebruiken broedeieren te minimaliseren zijn er twee belangrijke stappen ondernomen. De informatie afkomstig uit de embryo letaliteit assay (ELA) en de literatuurstudie, uitgevoerd voorafgaand aan het onderzoek, zijn gebruikt bij het maken van onderstaande poweranalyses.

De gebruikte "effect grootte" is het verwachte verschil in embryonale sterfte tussen de controlegroep en de experimentele groep waarbij de hoogste embryonale sterfte gezien wordt. Alle experimentele groepen worden individueel met de controlegroep vergeleken en niet onderling met elkaar. Het doen van de berekeningen met de hoogste verwachte embryonale sterfte zorgt ervoor dat er altijd genoeg statistische power is voor het vaststellen van significante effecten bij alle experimentele groepen waarbij het sterftepercentage lager ligt. Hier is voor gekozen om te voorkomen dat een aantal groepen niet gebruikt kunnen worden (vanwege te weinig power) waardoor er onnodig broedeieren en daarmee tevens ook kuikens gebruikt zijn voor deze proef. Alle experimentele groepen worden individueel met de controle groep vergeleken en niet onderling met elkaar. Vervolgens, na het berekenen van het aantal benodigde broedeieren, is voor de berekeningen van het maximale aantal proefdieren gerekend met een scenario dat tegen verwachting wel alle kuikens uitkomen, dus dat het sterftepercentage van de embryo's veel lager is dan verwacht. Het maximale aantal proefdieren die dus zijn berekend zijn dus naar verwachting veel hoger dan het werkelijke aantal ingezette proefdieren. Ook zullen de berekeningen waar nodig worden aangepast tussen de proeven in als nieuwe informatie uit de literatuur, ELA resultaten of voorgaande proeven beschikbaar zijn die aanleiding geven om de aantallen broedeieren aan te passen.

In verschillende ELA is een verband gevonden tussen de resultaten van een ELA en de virulentie van de bacteriën. Uitgaande van het feit dat er alleen isolaten gebruikt worden die voor embryonale sterfte zorgen tijdens de ELA, in combinatie met de observaties uit de veldstudie verwachten we (zeer) virulente bacteriën te selecteren.

Uit recente literatuur blijkt dat bij een dosis van 10^6 kolonie vormende eenheden (KVE) *Enterococcus cecorum* (zeer virulente isolaten) per ei de embryonale sterfte tussen de 50-70% zal zijn (Arango *et al.*, 2023). Voor de power-analyses zijn wij uitgegaan van een sterftepercentage van 50% indien de eieren zijn geïnoculeerd met zeer virulente bacterie-isolaten. In de controle groep verwachten we een embryonale sterfte van 10%.

Gemiddeld komt 90% van de eieren in commerciële broederijen uit.

Met deze effect grootte zijn er 40 broedeieren per groep nodig.

Er zullen acht onderzoeksgroepen en één controlegroep gebruikt worden.

Wanneer, tegen alle verwachtingen in, al deze eieren uitkomen (100% uitkomstpercentage/0% sterftepercentage) zullen er 360 proefdieren gebruikt worden.

Dierproef 2:

Om een verschil aan te tonen in totale sterfte (vanaf moment van inoculeren tot 7 dagen na uitkomst) tussen één van de bacteriële doseringsgroepen en de controle-groep aan te tonen gaan wij uit van de volgende aanname. [REDACTED] zal het verwachte sterftepercentage respectievelijk 10%, 65% en 71% zijn (verder uitgewerkt bij E. Human Endpoints).

Op basis van deze schatting is er uitgegaan dat er voldoende power moet zijn om een verschil in verwachte effect grootte van 50% in de experimentele groepen ten opzichte van 90% in de controle groep aan te tonen. Hierdoor komt het totaal aantal benodigde broedeieren per groep op 40.

Daarnaast zal er één controle groep van 40 dieren worden gebruikt.

Wanneer, tegen alle verwachtingen in, al deze eieren uitkomen zullen er 280 proefdieren gebruikt worden.

Dierproef 3:

Verwacht wordt dat er meer sterfte plaatsvindt bij de broedeieren die in het embryo geïnjecteerd worden dan bij broedeieren die in de amnionholte geïnjecteerd worden. Aangenomen dat er een sterftepercentage van [REDACTED] (amnion) en [REDACTED] (embryo) zal zijn, zijn er 63 dieren per groep nodig (op basis van de uitgevoerde poweranalyse) om een statistisch verschil aan te kunnen tonen. Er zijn in totaal vier groepen [REDACTED]

Om te controleren of het broedproces en het toedienen van steriele inocula geen effect op de uitkomst hebben zal er een (kleinere) controlegroep van 20 dieren gebruikt worden. Wanneer, tegen alle verwachtingen in, al deze eieren uitkomen zullen er 272 proefdieren gebruikt worden.

Dierproef 4:

Elke rij, van vier eieren die opeenvolgend geïnjecteerd zijn, worden in deze proef als één experimentele eenheid gezien.

Het doel van het experiment is om effectieve transmissie van een geïnfecteerd geëmbryoneerd ei naar daaropvolgende geïnjecteerde eieren aan te tonen. Hierbij willen we een verschil in de overleving van de embryo's, besmet met bacterie-isolaten vanuit [REDACTED]

De verwachting is dat het overlevingspercentage in de besmette groepen ongeveer 50% is.

De verwachting is dat in de controle groep geen bacteriële verspreiding plaatsvindt en het overlevingspercentage 90% is.

Met deze verwachte effect grootte zijn er 40 experimentele eenheden nodig. Er zitten vier broedeieren in een experimentele eenheid. Er worden vier verschillende locaties gecontamineerd.

In totaal, wanneer tegen alle verwachtingen in al deze eieren uitkomen, zullen er 640 proefdieren gebruikt worden.

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Kip	Vleeskuikens	Geëmbryoneerde eieren	1552	m/v	No	nvt

Provide justifications for these choices

Species	Er is voor vleeskuikens van het merk Ross 308 gekozen omdat dit het doeldier is. De keuze voor het gebruik van dit ras is gebaseerd op het feit dat deze kippen het meest in de praktijk gebruikt worden, zodoende wordt er zo dicht mogelijk bij de praktijksituatie gebleven.
Origin	Eieren van vleeskuikenouderdieren afkomstig van een commerciële broederij van het merk Ross 308, de vleeskuikenouderdieren hebben geen historie met klinische problemen veroorzaakt door <i>E. coli</i> en/of <i>E. faecalis</i> . Deze eieren worden getransporteerd naar de onderzoeksfaciliteiten van de faculteit diergeneeskunde. Hier worden de eieren bebroed tot uitkomst en na uitkomst worden de kuikens in een experimentele stal geplaatst en verzorgd tot de gewenste leeftijd.
Life stages	Achttien dagen bebroede geëmbryoneerde eieren worden gebruikt. Op deze embryonale leeftijd wordt de in ovo vaccinatie altijd uitgevoerd. Daarna worden deze eieren (3 dagen) en uitgekomen dieren (7 dagen) (dus totaal 10 dagen) gemonitord.
Number	Dierproef 1: 360 Dierproef 2: 280 Dierproef 3: 272 Dierproef 4: 640 Totaal: 1552 Dit aantal proefdieren is het maximale aantal dieren wat uit het ei zou kunnen komen wanneer alle ingelegde eieren uitkomen. Dit aantal is gebaseerd op een gemaakte poweranalyses met een de bovengenoemde effect grootte.
Gender	Beide geslachten zullen worden gebruikt. Om het geslacht te bepalen van kuikens in het ei moet er een gat in de eischaal gemaakt worden, dit is een risico voor het introduceren van bacteriën en kan de resultaten van deze proef negatief beïnvloeden. Daarnaast zijn er geen aanwijzingen in de literatuur dat er op deze leeftijd verschillen zijn in de gevoeligheid voor bacteriële infecties.
Genetic alterations	Er wordt gebruik gemaakt van commerciële rassen.
Strain	nvt

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

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

Click or tap here to enter text.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

Het is mogelijk dat de dieren een korte periode van algehele malaise zullen doormaken. Wanneer dit zo is zullen dieren die voldoen aan de criteria, onmiddellijk humaan worden gedood (criteria zie A.). Er zal dan dus geen behandeling of pijnbestrijding worden toegepast.

Preventieve pijnbestrijding is contra-geïndiceerd omdat deze behandeling bepaalde signalen die wijzen op aanstaande dood, kunnen maskeren. Hierdoor zouden de dieren onnodig langer in leven blijven om vervolgens alsnog te sterven.

Daarnaast is anesthesie op basis van ontstekingsremmende middelen contra-geïndiceerd omdat deze mogelijk het immuunsysteem onderdrukken, waardoor onderzoeksresultaten mogelijk worden beïnvloed.

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

Click or tap here to enter text.

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

In de eerste levensweek worden er geen andere oorzaken van ongerief verwacht dan die eerder besproken zijn.

Explain why these effects may emerge.

Click or tap here to enter text.

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

Click or tap here to enter text.

E. 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 F

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

Op dit moment zijn er geen niet-invasieve methoden bekend om humane eindpunten van kippenembryo's te bepalen. Er zijn verschillende manieren om een embryo niet-invasief te monitoren, hierbij kan gedacht worden aan het schouwen (doorschijnen met licht) van geëmbryoneerde eieren of een MRI-scan maken van een geëmbryoneerd ei (Manders *et al.*, 2021). Voor beide methode is nog niet bekend hoe pijn of andere vormen van ongerief kunnen worden gediagnosticeerd.

Embryo's reageren op verschillende stimuli van buiten het ei, denk hierbij aan licht en temperatuur. Ervaring leert dat embryo's reageren (bewegen) wanneer een sterke lichtbron op het ei geplaatst wordt om te schouwen. Naar mate het embryo groeit en dicht bij het moment van uitkomen komt is er in het ei minder ruimte om te bewegen. Enkel de kop met snavel heeft in de luchtkamer ruimte om te bewegen, dit om uiteindelijk de eischaal aan te prikken. Tijdens het schouwen van eieren worden vaak geen bewegingen waargenomen van de

kop/snavel in de luchtkamer bij levende niet aangedane embryo's. Op dit moment is er geen praktisch haalbare manier om het humane eindpunt van embryo's op een niet invasieve manier te bepalen.

Kuikens die direct na het leven aangeboren aandoeningen hebben die niet verenigbaar zijn met het leven worden direct gedood. Criteria hiervoor zijn:

- Kuikens zijn niet in staat om zich te verplaatsen.
- Kuikens zijn niet in staat zelf water en voer op te nemen.

Voorbeelden van aangeboren afwijkingen zijn: afwijkingen aan snavels, open abdomen en afwijkingen aan de poten.

Voor levende kuikens in de eerste levensweek hebben we onderstaande humane eindpunten geformuleerd, deze zijn gebaseerd op het onderzoek van Matthijs *et al.* (2017). In dit onderzoek zijn gedragingen die wijzen op aanstaande dood beschreven. Op basis van de beschreven gedragingen is het mogelijk om de kuikens uit het onderzoek te halen zonder dat de resultaten beïnvloed worden.

Het doel van onderstaande humane eindpunten is om dieren die in de fase van aanstaande dood komen zo snel mogelijk humaan te doden. Door elke 6 uur een observatie (en een beslissing) uit te voeren is de periode van ongerief zeer kort.

Definitie:

Het humane eindpunt is bereikt wanneer een dier in een of meerdere categorieën een score krijgt van **in totaal 2** of hoger.

Wanneer een kuiken 2 opeenvolgende observaties een score van 1 krijgt is het humane eindpunt ook bereikt.

De categorieën met bijbehorende scores zijn als volgt:

- Mate van bewustzijn
- 0) Kuiken reageert op een harde klap van de handen op elkaar door het één oog te draaien in de richting van het geluid (opkijken)
 - 1) Vogel reageert niet op een harde klap van de handen op elkaar, maar reageert wel op zachte aanraking (met een vinger) van het midden van de vleugel. De vogel blijft staan en wordt niet omgeduwd door de aanraking
 - 2) Vogel reageert niet op de handklap of op aanraking.
- Houding en gang
- 0) Normale houding. Hoofd, vleugel en staart* wijzen lichtelijk omhoog, wijzende op de spierspanning nodig voor het ondersteunen van het hoofd, de vleugels en de staart. Ogen zijn geopend.
 - 1) Vogel heeft normale houding (zoals hierboven beschreven) maar de ogen zijn gesloten.
 - 2) Vogel zit "bol" met hangende staart en vleugels, teruggetrokken nek, rommelig **dons- en** verenkleed maar ogen open.
 - 3) Vogel zit "bol" met hangende staart en vleugels, teruggetrokken nek, rommelig **dons- en** verenkleed en gesloten ogen.

*De staart van een eendagskuiken is klein en mogelijk lastig te beoordelen. Staart en vleugelveren beginnen op de eerste dag te groeien en zijn duidelijk waarneembaar als vleugel- en staartveren op het einde van de eerste week. Door deze groei van veren is de stand van de staart al snel te beoordelen. De normale houding van de dieren kan op basis van de houding van de vleugels en het hoofd worden beoordeeld.

Indicate the likely incidence.

Zeer virulente bacteriën:

In de eieren geïnoculeerd met de meest virulente bacterie, ██████████, verwachten we dat 50% van de kuikens uit het ei zal komen. Van deze 50% is de schatting dat 20-30% een bacteriemie zal ontwikkelen. Deze schatting is gebaseerd op inoculatie proeven van zeven dagen oude vleeskuikens met een virulente *E. coli* (Ariës *et al.*, 2016) en op onderzoek waarbij eieren zijn geïnoculeerd met *E. coli* bacteriën op dag 12 van het broedproces (Karunaratna *et al.*, 2022). Naar verwachting zal 15 % van de geïnoculeerde eieren het humaan eindpunt bereiken.

Virulente bacteriën:

De virulentie van ██████████ voor geëmbryoneerde eieren wordt lager in geschat dan die voor ██████████. Daarnaast wordt er op basis van de ELA ook een ██████████ stam geselecteerd welke minder virulent is. Voor deze bacteriën verwachten we dat meer kuikens uit het ei zullen komen (70%), maar een lager percentage van de dieren zal

een bacteriemie ontwikkelen (0-10%). Naar verwachting zal 7% van de geïnoculeerde eieren het humaan eindpunt bereiken.

Dierproef 1:

Voor dierproef één worden acht groepen geïnoculeerd met bacterie-isolaten of combinaties daarvan. Van deze groepen verwachten we dat vijf groepen worden geïnoculeerd met zeer virulente bacteriën of combinaties daarvan en drie groepen met virulente bacteriën. In de eieren geïnoculeerd met zeer virulente bacteriën zullen naar verwachting ongeveer 50% van de kuikens uit het ei komen, van deze kuikens zullen naar schatting 20-30% het humaan eindpunt bereiken. Voor de eieren geïnoculeerd met virulente bacteriën is de schatting dat 70% van de kuikens uit het ei komen, waarbij 0-10% van de uitgekomen kuikens het humane eindpunt zal bereiken. Dit betekent dat van de vijf groepen (zeer virulente bacteriën) 15% van de embryo's uit het ei komt en het humane eindpunt zal bereiken, en van drie groepen (virulente bacteriën) zal 7% het humane eindpunt bereiken.

Dierproef 2:

In deze dierproef worden twee zeer virulente bacterie-isolaten of combinaties daarvan getest. Naar verwachting zullen bij een concentratie van [REDACTED] ongeveer 50% van de kuikens uit het ei komen, met een percentage van 20-30% dat het humaan eindpunt bereikt.

Bij een concentratie van [REDACTED] is de schatting dat meer kuikens uit het ei zullen komen (ongeveer 70 %). Het percentage dieren dat het humane eindpunt bereikt, zal naar verwachting gelijk blijven (20-30%).

Bij een concentraties van [REDACTED] de schatting dat alle kuikens uit het ei zullen komen. Het percentage dieren dat het humane eindpunt bereikt zal naar verwachting laag zijn (0-10%)

Dierproef 3:

In deze dierproef worden twee zeer virulente bacterie-isolaten of combinaties daarvan getest met een concentratie waarbij 50% van de kuikens uit het ei zullen komen. In de groep waarvan de embryo's worden geïnoculeerd verwachten we dat minder kuikens uit het ei zullen komen [REDACTED], bij de in het amnion vloeistof geïnoculeerde groep verwachten we een uitkomst van 50%. We verwachten dat in alle groepen het percentage kuikens dat het humane eindpunt zal bereiken 20-30% is.

Dierproef 4:

In dierproef 4 worden verschillende onderdelen van het in ovo vaccinatie apparaat en van de geëmbryoneerde eieren gecontamineerd. De transmissie naar drie opeenvolgend gevaccineerde eieren wordt getest, het is aannemelijk dat de bacteriële contaminatie afneemt per geïnoculeerd ei.

We verwachten dat uit de geïnoculeerde eieren 50% van de kuikens uitkomt, van deze kuikens zal een percentage van 20-30% het humaan eindpunt bereiken.

Uit de daaropvolgende geïnoculeerde eieren zullen meer kuikens uit het ei komen (70-100%), waarbij minder kuikens het humaan eindpunt zullen bereiken (0-10%).

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Er worden overall 1552 eieren bebroed. Voor de onderverdeling naar ongeriefklassen zoals in de tabel hieronder weergegeven is ervan uitgegaan dat alle kuikens uit het ei komen en dus ongerief zullen kunnen ervaren.

	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 4	Totaal
Aantal geïnoculeerde eieren	360	280	272	640	1552
Geschat aantal kuikens licht ongerief*	298	232	205	566	1301
Geschat aantal kuikens matig ongerief*	5642	4433	6347	6448	227170
Geschat aantal kuikens ernstig ongerief*	206	415	420	1026	2481

*Bij het schatten van het aantal kuikens met ongerief is ervan uitgegaan dat alle kuikens uit het ei komen.

De inschatting is dat de aantallen (aanzienlijk) lager zullen uitkomen, aangezien naar alle waarschijnlijkheid niet alle eieren zullen uitkomen. Zoals beschreven onder E zullen er mogelijk 1006 kuikens uit het ei komen: 224 in proef 1, 179 in proef 2, 272 in proef 3 en 480 in proef 4.

Toelichting op de ongeriefindeling:

Inoculatie 18 daags bebroedde geëmbryoneerde kippeneieren:

- Inbrengen van een injectienaald

Alle geëmbryoneerde eieren zullen op dag 18 van het broedproces worden geïnjecteerd. Het ongerief van deze handeling wordt ingeschat als mild.

- Systemische infectie van embryo's ten gevolgen van een bacteriële infectie

Embryo's die sterven in het ei kunnen mogelijk pijn of andere vormen van ongerief ervaren. Het inschatten van de duur en de ernst van de pijn is lastig. Het ongerief van een systemische infecties in embryo's wordt ingeschat als ernstig. Bij onderdeel E. is beschreven hoeveel embryo's per dierproef mogelijk dit ongerief zullen kunnen ervaren, dit zijn in totaal 546 embryo's.

Hanteren kuikens direct na uitkomst:

- Bepalen Tona score:

Bij het uitvoeren van de Tona score worden kuikens gehanteerd en worden de volgende parameters beoordeeld: activiteit, donsveren, opname van de dooier, ogen, poten, navel en eventueel membranen die nog aanwezig zijn.

- Bepalen van kuikenlengte:

Om de kuikenlengte te bepalen wordt een kuiken volledig gestrekt en de lengte van de snavel tot aan de teen gemeten.

Het ongerief van deze handeling (lengte bepaling en Tona score bepaling) wordt ingeschat als mild.

Honderd procent van de uitgekomen kuikens zal worden gescoord. De verwachting van het aantal kuikens dat uit het ei zal komen is hierboven beschreven (onderdeel E). Bij het schatten van het ongerief is ervan uitgegaan dat alle kuikens uit het ei komen. Het totaal aantal dieren dat mild ongerief ervaart is naar schatting 1301.

- Niet levensvatbare kuikens worden direct na uitkomst gedood.

Bij commerciële broederijen wordt gemeld dat ongeveer 0,5% van de uitgekomen kuikens afwijkingen heeft waardoor dieren niet in staat zijn om zelf in leven te blijven. Deze afwijkingen zijn vaak onder andere open abdomens, snavel afwijkingen (niet kunnen eten) en pootafwijkingen. Onze verwachting is dat de introductie van bacteriën op embryo dag 18 dit percentage niet zal beïnvloeden.

Het ongerief van deze dieren wordt ingeschat als ernstig. Elke 4 uur wordt er gecontroleerd hoeveel kuikens uit het ei gekomen zijn, indien deze aangeboren afwijkingen worden waargenomen worden deze dieren direct gedood. Het ongerief zal maximaal 4 uur duren. Naar verwachting zullen 8 (0.5% van 1552) dieren dit ongerief ervaren.

Hanteren kuikens tijdens de eerste levensweek:

- Algehele malaise door systemische bacteriële infectie

Tijdens de eerste levensweek is het mogelijk dat de kuikens een systemische bacteriële infectie (bacteriëmie) ontwikkelen. Het aantal dieren dat een bacteriëmie zal ontwikkelen is afhankelijk van de virulentie van de bacterie. In de [REDACTED] geïnoculeerde groepen verwachten we dat 20-30% van de kuikens een bacteriëmie zal ontwikkelen. Deze schatting is gebaseerd op inoculatie proeven van zeven dagen oude vleeskuikens met een virulente *E. coli* (Ariès *et al.*, 2016).

De virulentie [REDACTED] wordt lager ingeschat in vergelijking met [REDACTED]. We verwachten dat een lager percentage van de dieren zal een bacteriëmie ontwikkelen (0-10%).

Dieren worden direct gedood wanneer ze verschijnselen van deze bacteriëmie vertonen, in ieder geval binnen 6 uur (zie punt E). Een deel (ong. 25%) van deze kuikens zal voor een langere tijd ziek zijn (maximaal 6 uur) en tijdens deze periode zullen de dieren meer klinische verschijnselen gaan vertonen. Voor deze dieren schatten we het ongerief in als ernstig. Voor de overige dieren die kort klinische verschijnselen vertonen schatten we het ongerief in als matig. Het ongerief dat de dieren zullen ondervinden wordt ingeschat als matig. De verwachting

van het aantal kuikens dat het humaan eindpunt zullen bereiken is hierboven beschreven (zie onderdeel E). In totaal zullen 227 dieren matig ongerief ondervinden.

Ondanks een controle iedere zes uur bestaat de kans dat kuikens spontaan sterven. Kuikens kunnen peracut sterven ten gevolge van een systemische bacteriële infectie, deze kuikens sterven vaak erg snel na inoculatie (enkele uren). Deze kuikens vertonen geen klinische verschijnselen en staan nog te eten/drinken en sterven vaak kort (tiental minuten) daarna (). Kuikens die wel klinische verschijnselen vertonen zijn goed te identificeren en sterven vaak niet binnen een periode van 6 uur na het vertonen van klinische verschijnselen (Matthijs *et al.*, 2017). Het percentage kuikens dat spontaan zal sterven zonder dat dit tijdig opgemerkt zal worden schatten wij op 1% van het aantal uit het ei gekomen dieren. Het ongerief dat deze kuikens ervaren schatten wij in als ernstig, in totaal zullen dit 16 kuikens zijn.

- Kuikens wegen op dag 7

Alle kuikens die nog leven aan het einde van de dierproef (7 dagen na uitkomst) worden gewogen. Het ongerief van het wegen wordt ingeschat als mild.

G. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement	De belangrijkste parameter in deze studie is het percentage embryonale sterfte . Verschillen in embryonale sterfte kunnen niet worden onderzocht in een ander model waardoor we genoodzaakt zijn om het onderzoek uit te voeren in geëmbryoneerde kippeneieren.
Reduction	Door een veldstudie kregen we een duidelijk beeld welke bacteriën geïsoleerd worden uit eieren die niet zijn uitgekomen. Daaropvolgend is een embryo letaliteit assay uitgevoerd om de selectie van deze bacteriën te optimaliseren. Hierdoor is de kans groot dat er een effect wordt waargenomen en zijn er minder groepen nodig in het dierexperiment. ()
Refinement	Door de eieren iedere vier uur te controleren op uitkomst en de kuikens te verplaatsen naar de grondstallen, hebben de dieren sneller toegang tot water en voer. Doordat er vanaf dag 19.5 (na incubatie) elke vier uur wordt geobserveerd hoeveel kuikens uit het ei zijn gekomen, zullen niet levensvatbare kuikens gedood worden. Hierdoor zal het ongerief door eventuele aangeboren afwijkingen van kort zijn. Iedere zes uur worden de kuikens geïnspecteerd, door gebruik te maken van de resultaten uit Matthijs <i>et al.</i> (2017) kunnen kuikens die tekenen van aanstaande dood vertonen vroegtijdig gesignaleerd worden en, zonder dat de onderzoeksresultaten van de proef beïnvloed worden, gedood worden. Zo wordt het ongerief door het sterfproces zo kort mogelijk te houden.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

[Click or tap here to enter text.](#)

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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.

Click or tap here to enter text.

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

NVT

J. 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 K.

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.

Click or tap here to enter text.

3. End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Click or tap here to enter text.

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

De dieren worden aan het einde van het experiment gedood en macroscopisch, bacteriologisch en histologisch onderzocht. Dit om te bepalen of dieren laesies hebben door de geïnjecteerde bacteriën. Dieren kunnen geen ziekteverschijnselen vertonen en toch laesies hebben van de injecteerde bacterie-isolaten.

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.

Click or tap here to enter text.

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Click or tap here to enter text.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Decapitatie. Volgens de Annex IV of Directive 2010/63/EU? Een geschikte methode voor vogels onder de 250 gram. Aangezien het gaat om eendagskuikens van +-45 gram en 7 daagse kuikens van 180 tot 200 gram is dit geschikt (Ross 308, performance manual).

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

Alle vleeskuikens worden aan het einde van de proef macroscopisch, bacteriologisch en histologisch onderzocht om laesies vast te stellen. Ook in de controle groep wordt gekeken naar aanwezigheid van laesies.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : AVD10800202317148
2. Titel van het project : Bacteriële contaminatie van in ovo toegediende vaccinaties
3. Titel van de NTS : Bacteriële contaminatie van in ovo toegediende vaccinaties

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht
Telefoonnummer contactpersoon : 06-31118069
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ontvangen door DEC: 19-6-2023 en 11-8-2023 (herziene versie)
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 21-6-2023 en 16-8-2023
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 6-7-2023 (advies niet-toetsbaar)-11-8-2023 en 23-8-2023- 6-9-2023
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
Toegekend, als het goed is, maar de brief met het besluit heeft de DEC niet ontvangen.
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 14-9-2023

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

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 16-8-2023
- Plaats: Online in Teams
- Aantal aanwezige DEC-leden: 7
- Aanwezige (namens) aanvrager: Verantwoordelijk onderzoeker
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden: De DEC heeft de onderzoekers o.a. gehoord over onderstaande vragen.
- Daarbij ging het o.a. over de desinfectie met waterstofperoxide. *Antwoord: waterstofperoxide is een optie, maar er wordt waarschijnlijk met hypochloriet ontsmet en de tijd van inwerking is cruciaal. De vraag is of de huidige blootstelling in seconden genoeg is om de infectiedruk naar beneden te brengen.*

- Dieren kunnen spontaan dood gaan door een bacteriemie. Doordat u vaak gaat controleren, zal de duur maximaal 6 uur zijn. Kunt u billijken dat het ongerief maximaal matig zou zijn?
Antwoord: Op basis van de selectiecriteria, die we beschreven hebben, denken wij, dat de dieren zich een korte tijd niet lekker voelen. De controle (elke 6 uur) is n.a.v. conclusies uit het onderzoek van Matthijs et al. De dieren zijn nog niet comateus (reageren nog op prikkels/ hebben nog 2 van de symptomen). De kans bestaat dat er dieren sopereus zijn. Een E. Coli infectie kan heel langzaam gaan (en die herken je met de 6 uurs observatie) of zo snel tot de dood leiden (binnen 1 uur), dat de dieren nog voeding in hun krop hebben en geen macroscopische afwijkingen vertonen.

Hieruit zijn onderstaande vragen, zoals vermeld bij punt A9, voortgekomen, die schriftelijk aan de onderzoekers werden voorgelegd.

- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 23-8-2023
- Datum antwoord: 6-9-2023
- Strekking gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

3.1 Achtergrond

- U schrijft over het desinfecteren van vieze eieren met waterstofperoxide (gas) Waarom werkt deze methode mono niet goed genoeg?
Antwoord: Het desinfecteren van de broedeieren wordt toegepast op alle eieren voordat deze eieren de broedmachine ingaan. Tijdens het leggen van het ei is de cuticula op de eischaal nog niet voldoende uitgehard en beschermd de poriën in de schaal nog niet. Bacteriën kunnen op dat moment deze poriën betreden, dit proces wordt bevorderd door het afkoelen van de eieren. Het effectief desinfecteren van broedeieren zou binnen 30 minuten na het leggen van het ei dienen te gebeuren. Dit is praktisch niet haalbaar.
- Als deze desinfectiemethode beter onderzocht wordt, zou het dan een alternatieve methode kunnen zijn voor vaccinatie?
Antwoord: Vaccinaties worden toegepast op dag 18 van het broedproces en de gangbare vaccins zijn meestal tegen virale infecties (o.a. aviaire influenza), deze vaccinaties kunnen bacterieel gecontamineerd zijn en juist deze contaminaties willen we graag onderzoeken in dit project.
- De desinfectie zoals die op dit moment wordt toegepast werkt onvoldoende en daarbij is (te) weinig inzicht waar en welke specifieke preventieve maatregelen genomen moeten worden om de bacteriële contaminatie te voorkomen. Met dit onderzoeken hopen we meer inzicht te krijgen hoe en waar de contaminaties plaatsvinden om zo preventieve maatregelen te kunnen nemen.

- Zou je niet beter alle eieren met waterstofperoxide (gas) kunnen behandelen i.p.v. alleen de vieze eieren, voordat je *in ovo* gaat vaccineren?

Antwoord: Alle eieren worden gedesinfecteerd voordat ze de broedmachine ingaan.

Tekst in projectvoorstel aangepast.

3.4 Strategie

- Bij go no-go moment 3 noemt u, dat er hoge embryonale sterfte kan zijn in de negatieve controle van meer dan 20% (en dat het experiment dan opnieuw moet), terwijl u 2-3% verwacht. Kunt u toelichten, waarom u voor 20% zo'n hoog percentage kiest? Wat kan de oorzaak zijn voor zo'n hoog percentage?

Antwoord: Het uitkomstpercentage kan door veel factoren worden beïnvloed. Dit kunnen eerdere infecties van het embryo zijn of problemen tijdens het broedproces (o.a. te lage/hoge temperatuur, verkeerde luchtvochtigheid in de broedmachine), daarnaast zijn er ook zeldzamere oorzaken zoals voedingsdeficiënties van de moederdieren of embryonale afwijkingen. Door de embryonale sterfte macroscopische en bacteriologisch te onderzoeken kunnen we bepalen wat de mogelijke oorzaak van de sterfte is. We verwachten infecties te kunnen diagnosticeren op basis van afwijkingen aan de embryo's tijdens macroscopisch onderzoek of op basis van de resultaten van het bacteriologisch onderzoek. Indien er een infectie wordt gezien tijdens het onderzoek willen we eerst kijken wat de mogelijke oorzaak is voordat we verder gaan met de daaropvolgende experimenten. Dit is aangevuld onder het kopje strategie.

- Indien er iets is misgegaan in het broedproces verwachten we ook een verminderde uitkomst in de controle groep. Wanneer het broedproces gering of matig werd beïnvloed verwachten we een gering effect op het uitkomstpercentage (>10%). We verwachten dan niet dat het de gevoeligheid van de embryo's voor de bacteriën verhoogd. Het eerder genoemd percentage van 20% is inderdaad aan de hoge kant en zou wel kunnen impliceren dat het de resultaten van de dierproef beïnvloed. We hebben dit percentage in aangepast naar 10%.

Bijlage 1

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

- U refereert naar Matthijs *et al.*, 2017, maar hebt geen literatuurlijst bijgevoegd. Wilt u dat nog doen?

Antwoord: Literatuurlijst is bijgevoegd in een apart document.

- Voor de observatie van jonge kuikens gebruikt u terminologie, die niet past bij de leeftijd. Kuikens hebben bijvoorbeeld nog geen veren. Wilt u dat aanpassen?

Antwoord: Bij de kip zijn de vleugeltjes en de staart als eerste bevederd; dit verenkleed begint al op de eerste dag te groeien en is op het einde van de eerste week duidelijk als vleugel- en staartveren te zien. Het beoordelen van de staart en vleugels zal gedurende de eerste levensweek wel kunnen aan de hand van veren. Er is een zin in de bijlage toegevoegd dat ook het donskleed zal worden beoordeeld.

- U kijkt naar een hangende staart, maar een jong kuiken heeft nog geen staart. Wilt u daarvoor in de plaats een andere methode noemen?

Antwoord: De staart zal in de eerst dag wellicht wat lastiger te beoordelen zijn, maar deze is wel waarneembaar. Het beoordelen van de houding van de kuikens berust naast het beoordelen van staart ook op de houding van de vleugels (afhangen) en de houding van de kop. Ondanks dat de staart mogelijk minder accuraat beoordeeld kan worden, kan er wel bepaald worden of de kuikens een normale of afwijkende houding hebben.

F. Classificatie van ongerief

- Systemische bacteriële infectie (bacteriëmie) wordt door u als matig ongerief geclassificeerd. Waarom kiest u niet voor ernstig ongerief bij voordeel van de twijfel?

*Antwoord: Vanuit studies met E. coli infecties bij pluimvee is gekend dat dieren peracuuft of acuut sterven aan deze infectie. Indien kippen **peracuuft** sterven aan de ziekte kan er worden waargenomen dat deze dieren binnen een uur nadat ze nog aten en dronken zeer plotseling dood waren. Tijdens macroscopisch onderzoek worden ook geen laesies in deze dieren aangetroffen. Op basis van recent eten en drinken hebben we het ongerief ingeschat als matig voor deze dieren.*

- Wanneer kippen **acuut** sterven vertonen deze dieren klinische verschijnselen met name een verminderd bewustzijn en afwijkend houding. Door iedere 6 uur de dieren te beoordelen op deze klinische verschijnselen kunnen zieke dieren snel geïdentificeerd worden en indien deze dieren ziekteverschijnselen vertonen worden ze uit de proef gehaald. Door frequent de dieren te controleren zullen naar onze verwachting geen dieren lange tijd (iedere 6 uur controle) blijven zitten met klinische verschijnselen en daardoor ook geen ernstige klinische verschijnselen ontwikkelen. Daarnaast wordt er tijdens het macroscopisch onderzoek van de (ge)dode dieren geconstateerd dat deze dieren recent (binnen 6 uur voor de dood) nog voer hebben opgenomen. Bij deze dieren zullen wel laesies ten gevolge van de bacteriële infectie worden waargenomen, de ernst van de laesies wisselt. Wij schatten het ongerief dat de dieren ervaren in als matig voor de meeste dieren omdat deze dieren kort geleden nog gegeten en gedronken hebben. Een deel van de kuikens met een bacteriëmie zal direct na een controle ziek worden en langer ongerief hebben dan kuikens die één uur de voor een controle ziek wordt. Wanneer een kuiken langer ziek is van de bacteriëmie zal deze meer ongerief ervaren. Om het ongerief niet te onderschatten en het ongerief veilig in te schatten hebben we het ongerief voor een deel van de kuikens verhoogd naar ernstig. We schatten in dat 25% van de kuikens dat een bacteriëmie ervaart langer ziek zal zijn en dus wellicht ernstig ongerief zal ervaren. We hebben dit aangepast in de DAP en de NTS.

Niet Technische Samenvatting

- Wilt u de tekst nog eens door iemand laten lezen en verbeteren?

Antwoord: De tekst is door een collega gelezen en de nieuwe tekst is aangegeven met een kleur en de oude tekst is doorgehaald.

- Purpose of the project: Wilt u toelichten, waarom een verlengde periode van uitkomst (hatch window) leidt tot meer ongerief?
Antwoord: Wanneer er een verlengde periode is dat kuikens uitkomen, zal het voor een deel van de kuikens langer duren voordat ze toegang hebben tot voer en water. Dit is toegevoegd in de NTS.
- Predicted harms: U schrijft "Een klein deel van de kuikens (10 dieren) zal spontaan sterven, de inschatting van het ongerief van deze dieren is ernstig. Naar verwachting zullen 8 dieren uit het ei komen met aangeboren afwijkingen die niet met het leven verenigbaar zijn, de inschatting van het ongerief is ernstig.", maar bij de Tab expected harms geeft u 24 dieren met ernstig ongerief. Wilt u de getallen met elkaar in overeenstemming brengen?
Antwoord: Dit is aangepast, het moeten 16 kuikens zijn in plaats van 10.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is één DEC-lid, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. *De aanvraag betreft het onderzoek naar verbeteringen van in-ovo vaccinaties bij kippen. Deze vorm van vaccineren heeft als voordeel dat alle kuikens in ovo al gevaccineerd kunnen worden, maar gaat met de huidige methoden gepaard met een hoog percentage uitval door het 'meeslepen' van bacteriële besmettingen. Door dit onderzoek wil men meer inzicht verkrijgen in welke processen en specifieke bacteriën bij in ovo vaccinatie bepalend kunnen zijn voor bacteriële contaminatie die leiden tot verhoogde embryonale sterfte en sterfte in de eerste levensweek. Op basis van deze kennis kunnen specifieke preventieve maatregelen genomen worden in broederijen en/of op moederdierbedrijven om contaminatie van het in ovo vaccinatie proces te voorkomen. Omdat er in de oorspronkelijke aanvraag werd aangegeven LD50 experimenten te willen uitvoeren, die verboden zijn, is de aanvraag terug gestuurd om zeker te zijn of daar sprake van was. De huidige aanvraag is grotendeels herschreven en voor de DEC heel goed leesbaar en begrijpelijk. Het onderzoek is uitgeschreven in verschillende subvragen die elkaar logisch opvolgen met heldere beslismomenten. De beschreven bacteriële contaminanten komen op broederijen voor, de beschreven parameters zijn beschreven en*

gevalideerd en worden in verschillende inoculum concentraties onderzocht, en de eieren en/kuikens worden zorgvuldig geobserveerd om ongerief zo veel mogelijk te beperken.

De aanvraag komt het meest overeen met voorbeeld 1A uit de nieuwe Handreiking "Invulling Definitie Project".

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën), te weten fundamenteel onderzoek en translationeel onderzoek, sluiten aan bij de hoofddoelstellingen.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is *inzicht krijgen in welke processen en specifieke bacteriën bij in ovo vaccinatie bepalend kunnen zijn voor bacteriële contaminatie die leiden tot verhoogde embryonale sterfte en sterfte in de eerste levensweek*. Het uiteindelijke doel is *adviseren van specifieke preventieve maatregelen die genomen kunnen worden in broederijen en/of op moederdierbedrijven om contaminatie van het in ovo vaccinatie proces te voorkomen*. Deze maatregelen helpen om het welzijn en de gezondheid van eendagskuikens te verbeteren en vermindert zowel embryonale sterfte als sterfte in de eerste levensweek. Deze maatregelen kunnen er toe leiden dat er minder antibiotica hoeven te worden gebruikt in de pluimveeketen.

De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel, en dat het doel gerechtvaardigd is in de context van het onderzoeksveld en de behoeften vanuit kippenbroederijen en maatschappij.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn weergegeven in onderstaande tabel:

Morele waarden die worden bevorderd:	Welzijn	Autonomie	Rechtvaardigheid
Belanghebbenden			
Veterinaire volksgezondheid		<i>kunnen geven van advies over specifieke preventieve maatregelen, verminderen antibiotica gebruik</i>	<i>Belangrijk in keten om antibiotica gebruik zo veel mogelijk te reduceren</i>
Eieren en bebroede kuikens	<i>Geen infecties, pijn, ziek zijn, goede gezondheid</i>		<i>Reëel belang</i>
Producenten van in-ovo vaccinatie apparatuur		<i>kwaliteitsverbetering</i>	<i>Economisch belang</i>
Broederijen/ pluimveesector	<i>Minder broedeieren nodig voor aantal uit te broeden kuikens,</i>	<i>gevaccineerde kuikens zijn geen bron van besmetting</i>	<i>Welzijnsbelang, economische geen belang</i>
Onderzoekers		<i>Toenemen kennis</i>	<i>Gebruik onderwijs en financieel belang (opdracht voor dit onderzoek)</i>
Morele waarden die in het geding zijn:			
Proefdieren in dit project*	<i>Geen pijn Geen stress Gezondheid Geluk</i>	<i>Natuurlijk gedrag Bewegingsvrijheid</i>	<i>Intrinsieke waarde Integriteit Geen instrument zijn</i>

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

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

De aanvragers en leden van de onderzoeksgroep hebben eerder onderzoek op dit gebied uitgevoerd en bestaat uit medewerkers van de Universiteit, een onafhankelijk (wetenschappelijk) consultant en een farmaceutisch bedrijf. De medewerkers van de faculteit bezitten een brede kennis over de pluimveehouderij, bacteriële infecties bij pluimvee en over het (in ovo) vaccineren van kippen(eieren). De afgelopen jaren zijn al experimenten uitgevoerd om de inoculatie techniek en de succespercentages daarvan in de eieren met embryo's op verschillende leeftijden te onderzoeken. Deze resultaten zijn gebruikt om de virulentie van verschillende bacteriën te toetsen in een ELA.

8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. *De onderzoekers hebben goed beschreven bij de strategie waarop de keuze van de contaminanten is gebaseerd in een veldstudie. Vervolgens wordt de virulentie vastgesteld en wordt vastgesteld of deze bacteriën overdraagbaar zijn (geen dierproeven). Op basis van deze gegevens worden stapsgewijs (en na elkaar volgend) de dierproeven uitgevoerd die gaan bijdragen aan het behalen van de doelstellingen. Tussen de beschreven experimenten zijn er beslismomenten met heldere parameters en criteria voor de volgende stap.*

Welzijn dieren

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:

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

De gekozen diersoort is tevens doeldier.

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. *Er is helder beschreven wat de eieren/kuikens kunnen ondergaan, de inoculatie gebeurt in ovo en is geen dierproef. De eventuele infecties veroorzaken pijn en ongerief bij de kuikens en dat is beschreven. Opvallend is dat men opgenomen heeft dat alle kuikens levensvatbaar uit het ei zullen komen om het ongerief zo goed mogelijk in te schatten. Het is echter realistisch dat een deel van de eieren niet zal uitkomen.*
12. De integriteit van de dieren wordt *fysiek en mogelijk gedragsmatig aangetast door de infecties.*
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. *Er zijn humane eindpunten aangegeven voor kuikens die geboren worden met een infectie. De DEC had vragen gesteld over of het ook mogelijk is voor een ongebooren kuiken een humaan eindpunt aan te geven, maar de onderzoekers hebben uitgelegd dat dit niet mogelijk is voor een ongebooren kuiken. Criteria voor net uitgekomen kuikens en kuikens van 1 – 7 dagen zijn goed en navolgbaar weergegeven.*

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. *Een groot deel van het onderzoek wordt al met in-vitro methoden uitgevoerd met de ELA (Embryo Letaliteit Assay) methode, dit is een screeningsmethode en is niet geschikt om de daadwerkelijke onderzoeksvraag te beantwoorden, omdat de eieren in de praktijk op dag 18 worden gevaccineerd en dit dus ook als het moment van besmetting gezien wordt. Het afweersysteem van deze dieren is in dit stadium van de embryo-ontwikkeling veel verder ontwikkeld, waardoor de effecten van bacteriële contaminatie niet te vergelijken zijn. Daarnaast is het met dit model onmogelijk om kuikenvitaliteit en gezondheid in de eerste week te monitoren, omdat deze dieren niet uitkomen.*
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. *Vóór de dierexperimenten is mbv ELA uitgezocht welke bacteriën in vivo onderzocht moeten worden. Dit zorgt ervoor dat er geen onnodige experimentele groepen gecreëerd zullen worden en dus minder proefdieren nodig zijn. Daarnaast kan de verwachte effect grootte die gebruikt is voor de power analyse met de kennis uit de ELA getoetst en indien nodig bijgesteld worden. De verschillende dierexperimenten zijn opeenvolgend ingepland. Hierdoor is het aantal experimentele groepen verminderd, omdat de vervolg experimenten slechts uitgevoerd worden met de bacterie-isolaten en de concentraties die in de voorgaande experimenten relevant zijn gebleken.*

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. *Om het ongerief na/tijdens uitkomst te voorkomen, zullen alle eieren vanaf dag 19.5 van het broedproces elke vier uur geïnspecteerd worden waardoor vroeg uitgekomen kuikens (voor dag 21) slechts een korte tijd in de uitkomstkamer doorbrengen. Dieren die als gevolg van de injectie een bloedvergiftiging ontwikkelen zullen direct uit de proef gehaald worden. Men kan aan de hand van specifieke verschijnselen voorspellen of kuikens dood zullen gaan en deze kennis wordt toegepast. Alle dieren worden in de eerste levensweek elke zes uur geïnspecteerd en er wordt bepaald of deze verschijnselen aanwezig zijn om zodoende snel een humaan eindpunt te kunnen toepassen indien noodzakelijk.*

17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet.

19. De dieren worden in het kader van het project gedood om macroscopisch, bacteriologisch en histologisch te kunnen onderzoeken. De dieren worden op een passende wijze, in overeenstemming met bijlage IV van de EU richtlijn, gedood.

20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk *het inzicht krijgen in welke processen en specifieke bacteriën bij in ovo vaccinatie bepalend kunnen zijn voor bacteriële contaminatie die leiden tot verhoogde embryonale sterfte en sterfte in de eerste levensweek met uiteindelijk het adviseren van specifieke preventieve maatregelen die genomen kunnen worden in broederijen en/of op moederdierbedrijven om contaminatie van het in ovo vaccinatie proces te voorkomen. Deze maatregelen helpen om het welzijn en de gezondheid van eendagskuikens te verbeteren en vermindert zowel embryonale sterfte als sterfte in de eerste levensweek. Deze maatregelen kunnen er toe leiden dat er minder antibiotica hoeven te worden gebruikt in de pluimveeketen de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.*

2. Er vindt een grotendeels beperkte maar deels aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met licht ongerief voor 1301 kuikens, 227 kuikens met matig ongerief en 27 kuikens met ernstig ongerief indien alle kuikens levend geboren zouden worden. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er toe bijdragen dat duidelijk is of in-ovo vaccinatie goed toepasbaar is als alternatief voor de gangbare vaccinaties met minder verlies van kuikens en minder uitbraken van infecties waardoor tijdens de opfokfase minder antibiotica hoeven te worden toegediend. Het is aannemelijk dat de fundamentele en translationele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.
3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat *het inzicht krijgen in welke processen en specifieke bacteriën bij in ovo vaccinatie bepalend kunnen zijn voor bacteriële contaminatie die leiden tot verhoogde embryonale sterfte en sterfte in de eerste levensweek en het uiteindelijke doel het adviseren van specifieke preventieve maatregelen die genomen kunnen worden in broederijen en/of op moederdierbedrijven om contaminatie van het in ovo vaccinatie proces te voorkomen. Deze maatregelen helpen om het welzijn en de gezondheid van eendagskuikens te verbeteren en vermindert zowel embryonale sterfte als sterfte in de eerste levensweek. Deze maatregelen kunnen er toe leiden dat er minder antibiotica hoeven te worden gebruikt in de pluimveeketen hetgeen een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit substantiële belang opweegt tegen de grotendeels beperkte aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. De DEC heeft na discussie meegewogen dat er veel aandacht is in het op tijd kunnen toepassen van humane eindpunten en dat goede vaccinatie ook zal beschermen tegen uitbraken van ziekten die wilde vogelpopulaties kan treffen zoals vogelgriep. De relatie tussen het directe en het uiteindelijk doel is voldoende helder. Het is aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat er geen sprake zal zijn van onbedoelde negatieve effecten voor mens, dier en milieu als gevolg van de dierproeven. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.*

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.
- Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
- De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt: één lid heeft zich onthouden van het uitbrengen van een advies / stemming om verschillende redenen. Ten eerste is het in het kader van systeemverandering zorgwekkend het huidige patroon van steeds meer 'pleisters plakken' in het vleesproductiesysteem moeilijk te doorbreken is. Ten tweede heeft het lid een principiële zorg over de aantasting van de integriteit van het dier, in dit geval het kippenei, door de bacteriële infecties en de daarmee samenhangende vaccinatie. Hoewel dier- en volksgezondheid van groot belang zijn, zijn er alternatieve benaderingen om deze te waarborgen, zoals extensivering en barrières. Tenslotte maakt de complexiteit van de kwestie het voor dit lid moeilijk om het verschil te beoordelen tussen het doden van dieren voor vleesproductie en voor bacterie populatiebepaling, waardoor onthouding de meest eerlijke benadering lijkt.

3. De volgende knelpunten/dilemma's zijn naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.

- *Hoewel embryo's strikt genomen geen proefdieren zijn verwacht de onderzoeker dat een deel van de embryo's in ovo dood zal gaan door de (tijdens vaccinatie) ingesleepte bacteriële besmetting. Onderzoeker heeft op vragen van de DEC opgenomen dat in principe alle bevruchte eieren uit zullen komen en daarop het ongerief gebaseerd. De DEC kan waardering op brengen voor deze aanpak en neemt in haar afweging mee het aantal eieren dat is gebruikt voor vaccinatie omdat het deels niet uitkomen van de eieren of het uitkomen van geïnfecteerde eieren deel uitmaakt van de proefopzetten.*
- *De gehele commissie heeft gediscussieerd over de noodzaak van in-ovo vaccinatie versus systeemverandering maar heeft meegenomen dat goede vaccinatie ook preventief kan werken tegen besmettingen / uitbraken van ziekten die wilde dierenpopulaties betreft zoals vogelgriep.*



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0800 789 0789

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD10800202317148

Bijlagen

2

Datum 19 juni 2023

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 16 juni 2023. Het gaat om uw project "Bacteriële contaminatie van in ovo toegediende vaccinaties". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD10800202317148. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Datum:

19 juni 2023

Aanvraagnummer:

AVD10800202317148

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10800
Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: Population Health Science
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: Population Health Science
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 juni 2023
Geplande einddatum: 1 juni 2027
Titel project: Bacteriële contaminatie van in ovo toegediende vaccinaties
Titel niet-technische samenvatting: Bacteriële verontreiniging van in ovo toegediende vaccinaties
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 2.322,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen: Brief factuur, Begeleidende brief



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UU-AC



Postbus 80.011

3508 TA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD10800202317148

Bijlagen

2

Datum 19 juni 2023
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 19 juni 2023

Vervaldatum: 19 juli 2023

Factuurnummer: 2317148

Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD10800202317148	€ 2.322,00

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

From: [Info-zbo](mailto:info-zbo)
To: Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Cc: [REDACTED] "DEC-Utrecht@umcutrecht.nl"
Subject: Aanhouden AVD10800202317148
Date: maandag 25 september 2023 11:05:20

CAUTION: This email originated from outside of Utrecht University. Do not click links or open attachments unless you recognize the sender and know the content is safe.

Geachte [REDACTED]

Op 16-06-2023 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bacteriële contaminatie van in ovo toegediende vaccinaties" met aanvraagnummer AVD10800202317148. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

In uw NTS onder 'Reduction' noemt u de termen 'bacterie-isolaten' en 'power analyse'. Kunt u deze termen verhelderen in de NTS voor het algemene publiek? Kunt u daarnaast de term 'in ovo' in de titel verhelderen?

In uw NTS onder 'Refinement' verwijst u naar een publicatie van vermoedelijk een medewerker van uw instelling. De NTS dient anoniem te zijn en geen herleidbare verwijzingen naar personen te bevatten. Kunt u deze referentie verwijderen uit de NTS?

De doelcategorieën van uw NTS komen niet overeen met de doelcategorieën genoemd in het projectvoorstel. Kunt u deze in met elkaar overeenstemming brengen?

U heeft uw NTS ingediend in een Word format. Kunt u uw herziene NTS indienen in het daarvoor bestemde Excel bestand?

Onduidelijkheden

In uw projectvoorstel noemt u onder 3.4.1 dat voorafgaand aan de voorgestelde dierproef een embryo letaliteit assay wordt uitgevoerd als go/no-go moment. In deze assay zullen bacterie-isolaten aan de kippenembryo's worden toegediend en de embryonale sterfte zal worden bepaald. De beschreven assay is geen onderdeel van de dierproef, maar meer informatie over deze assay is nodig om voor de CCD een ethische afweging te kunnen maken over uw project. Kunt u in uw projectvoorstel onder 3.4.1 hoeveel embryo's u in de embryo letaliteit assay verwacht in te zetten?

In de bijlage dierproeven onder 'F. Classification of severity of procedures' noemt u dat in totaal 546 embryo's een ernstige systemische infectie zullen doorgaan. U schat het ongerief van deze systemische infecties in als ernstig. Dit aantal dieren dat ernstig ongerief zal ondergaan komt niet overeen met de aantallen in de tabel onder F. Kunt u dit in overeenstemming brengen, dan wel verhelderen?

Een deel van uw onderzoek zal worden uitgevoerd in dierproefvrije, in vitro methoden. Kunt u deze methode van (gedeeltelijke) vervanging benoemen in de bijlage dierproeven onder 'G. Replacement, reduction, refinement' bij 'Replacement'?

Gezien de inmiddels verstreken tijd, wordt u in de gelegenheid gesteld de gewenste start- en einddatum in uw aanvraagformulier te herzien. Mocht u hier gebruik van willen maken, wordt u verzocht een herzien en ondertekend aanvraagformulier in te sturen.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de

gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven


www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 789 0789

E: info@zbo-ccd.nl

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.



Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 93118
2509 AC 's-GRAVENHAGE

Faculteit Diergeneeskunde
Department of Population Health
Sciences

Bezoekadres
Yalelaan 7
3584 CL Utrecht6

Uw kenmerk	AVD10800202317148
Ons kenmerk	
Telefoon	
Fax	
E-mail	
Website	www.uu.nl
Datum	9 oktober 2023
Onderwerp	Beantwoording vragen AVD10800202317148
Bijlage	3

Geachte heer Overzier,

Onderstaand onze reactie op uw mail d.d. 25 september 2023.

Niet technische samenvatting

In uw NTS onder 'Reduction' noemt u de termen 'bacterie-isolaten' en 'power analyse'. Kunt u deze termen verhelderen in de NTS voor het algemene publiek?

De termen zijn verhelderd in de NTS.

Kunt u daarnaast de term 'in ovo' in de titel verhelderen?

Term is aangepast.

In uw NTS onder 'Refinement' verwijst u naar een publicatie van vermoedelijk een medewerker van uw instelling. De NTS dient anoniem te zijn en geen herleidbare verwijzingen naar personen te bevatten. Kunt u deze referentie verwijderen uit de NTS?

De referentie is verwijderd.



De doelcategorieën van uw NTS komen niet overeen met de doelcategorieën genoemd in het projectvoorstel. Kunt u deze in met elkaar overeenstemming brengen?

In de NTS aangepast.

U heeft uw NTS ingediend in een Word format. Kunt u uw herziene NTS indienen in het daarvoor bestemde Excel bestand?

De NTS zal worden ingediend in het daarvoor bestemde Excel bestand.

Onduidelijkheden

In uw projectvoorstel noemt u onder 3.4.1 dat voorafgaand aan de voorgestelde dierproef een embryo letaliteit assay wordt uitgevoerd als go/no-go moment. In deze assay zullen bacterie-isolaten aan de kippenembryo's worden toegediend en de embryonale sterfte zal worden bepaald. De beschreven assay is geen onderdeel van de dierproef, maar meer informatie over deze assay is nodig om voor de CCD een ethische afweging te kunnen maken over uw project. Kunt u in uw projectvoorstel onder 3.4.1 hoeveel embryo's u in de embryo letaliteit assay verwacht in te zetten?

Onder 3.4.1 hebben we de aantallen toegevoegd. Voor de ethische discussie zouden we u ook graag het volgende voorleggen. De laatste jaren wordt veel onderzoek uitgevoerd naar het ervaren van pijn bij kippenembryo's. Kollmansperger et al. (2023) beschrijft dat embryo's vanaf dag 13 nociceptieve stimuli kunnen ontvangen en verwerken en daarmee vanaf die leeftijd mogelijk pijn kunnen ervaren. In een studie van dezelfde groep (Weiss et al., 2023) wordt vanaf embryo dag 16 pas een verandering in het cardiovasculair systeem waargenomen na een pijn prikkel. Terwijl er vanaf embryo dag 15 een veranderend gedrag (verhoogd aantal bewegingen met de snavel) wordt waargenomen na een mechanische stimulus (Suss et al., 2023). Voorgaande studies tonen aan dat embryo's niet tijdens de gehele periode dat de ELA wordt uitgevoerd de mogelijkheid hebben om pijn te ervaren.

Een deel van de geïnoculeerde embryo's zal langer leven dan dag 13 en dus mogelijk pijn ervaren en alsnog sterven.

Er wordt verwacht dat bij inoculatie van virulente stammen op dag 12 de tijd tussen de inoculatie en sterfte kort zijn, wellicht voor dag 13.

In de bijlage dierproeven onder 'F. Classification of severity of procedures' noemt u dat in totaal 546 embryo's een ernstige systemische infectie zullen doorgaan. U schat het ongerief van deze systemische infecties in als ernstig. Dit aantal dieren dat ernstig ongerief zal ondergaan komt niet overeen met de aantallen in de tabel onder F. Kunt u dit in overeenstemming brengen, dan wel verhelderen?

We hebben ervoor gekozen om de aantallen op te nemen in de tabel van de dieren die uitkomen en niet het ongerief dat embryo's kunnen ervaren. Enkel de kuikens die uit het ei komen zullen geteld worden als proefdieren. Omdat we niet met zekerheid kunnen zeggen hoeveel kuikens er uit het ei zullen komen zijn we bij het inschatten van het ongerief ervan uitgegaan dat alle kuikens zullen uitkomen. Om een goede ethische afweging te kunnen maken hebben we ook een inschatting gemaakt hoeveel kuikens niet zullen uitkomen door een bacteriële infectie. Deze embryo's zullen ook ongerief ervaren en dit aantal



zal naar onze inschatting 546 dieren zijn. Dieren kunnen niet tweemaal ongerief ervaren en derhalve hebben we enkel het ongerief meegenomen van dieren die geclassificeerd worden als proefdieren. Onder het kopje "Inoculatie 18 daags bebroedde geëmbryoneerde kippeneieren" is kort een uitleg gegeven.

Een deel van uw onderzoek zal worden uitgevoerd in dierproefvrije, in vitro methoden. Kunt u deze methode van (gedeeltelijke) vervanging benoemen in de bijlage dierproeven onder 'G. Replacement, reduction, refinement' bij 'Replacement'?

Het is aangevuld dat de in vitro assay een vermindering van proefdieren tot gevolg kan hebben.

Met vriendelijke groet,

[Redacted signature]



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0800 789 0789

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD10800202317148

Bijlagen

3

Datum 26 oktober 2023

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 16 juni 2023 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bacteriële contaminatie van in ovo toegediende vaccinaties" met aanvraagnummer AVD10800202317148. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 27 oktober 2023 tot en met 1 juni 2027.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk juni 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Datum:

26 oktober 2023

Aanvraagnummer:

AVD10800202317148

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC Utrecht (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 14 september 2023. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 25 september 2023 en 9 oktober 2023 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het gebruik van vaktermen, de genoemde doelcategorieën en het ingediende format van de NTS, de onderbouwing van de proefopzet van de embryo letaliteit assay in het projectvoorstel en de ongeriefinschatting van de systemische infectie bij de dieren en het beschrijven van beschikbare proefdiervrije methoden in de bijlage dierproeven. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d en artikel 10a1, derde lid van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk juni 2028 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

Bezwaar

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

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen

bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

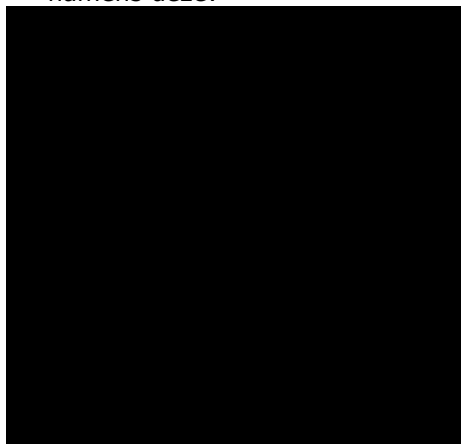
Datum:
26 oktober 2023
Aanvraagnummer:
AVD10800202317148

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

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Utrecht

Adres: Postbus 12007

Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT

Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 27 oktober 2023 tot en met 1 juni 2027, voor het project "Bacteriële contaminatie van in ovo toegediende vaccinaties" met aanvraagnummer AVD10800202317148, na advies van dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 16 juni 2023
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 9 oktober 2023;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1 Bacteriële contaminatie van in ovo toegediende vaccinaties, zoals ontvangen op 24 oktober 2023;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 9 oktober 2023;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 14 september 2023
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 9 oktober 2023, 24 oktober 2023.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.3.1 Bacteriële contaminatie van in ovo toegediende vaccinaties			
	Kippen / Vleeskuikens	1.552	5,2% Ernstig 11,0% Matig 83,8% Licht

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk juni 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.

Aanvraagnummer: AVD10800202317148

- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD10800202317148

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 van de wet staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd

Aanvraagnummer:
AVD10800202317148

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, eerste lid onder d en derde lid van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld.