



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef                        |
|------------|---------------------------------------|
| 1          | Neonatale BCG vaccinatie in resusapen |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Pasgeboren resusapen zullen eenmalig worden gevaccineerd met BCG wanneer ze tussen de 1 dag en 6 weken oud zijn. Dit is overeenkomstig met zoals dat ook gebeurt als onderdeel van de wereldwijde nationale vaccinatieprogramma's waarin BCG is opgenomen, met daarbij de verschillen in levensduur in acht genomen. De primaire uitkomstparameter is het hebben van een cohort van tussen de 20 en 30 BCG gevaccineerde dieren aan het eind van ieder geboorteseizoen. De door BCG opgewekte immunorespons van zowel het adaptieve als het aangeboren immuunsysteem zal in deze dieren worden gekarakteriseerd door middel van analyse van het bloed. Per jaar zullen 8 tot 12 dieren als cohort gematchte controles worden gebruikt om de responsen in de BCG gevaccineerde dieren te kunnen vergelijken met de responsen in niet-gevaccineerde dieren. Bij deze dieren zal geen vaccinatie worden uitgevoerd, maar zal wel gelijktijdig met de BCG gevaccineerde dieren een bloedafname worden gedaan. Dit is noodzakelijk, omdat ten tijde van vaccinatie geen bloed wordt afgenomen, vanwege de kwetsbaarheid van de baby's. De gevaccineerde dieren kunnen dus niet dienen als hun eigen controles. Tevens kunnen de niet-gevaccineerde dieren gebruikt worden als negatieve controles in de toekomstige TB boostervaccinatie en infectiestudies. Deze fase van boostervaccinatie en TB infectie is niet beschreven in deze projectaanvraag. Om deze handelingen (vaccinatie en bloedafname) bij de baby's te kunnen uitvoeren, is het nodig om de moederdieren te sederen.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Pasgeboren resusaap baby's worden intradermaal gevaccineerd met BCG wanneer ze tussen de 1 dag en 6 weken oud zijn. Dit gebeurt terwijl de baby's vastgeklampt zitten op de moeder. De baby's hoeven daarvoor niet gesedeerd te worden. De door BCG geïnduceerde respons zal worden gemeten in de periode dat deze piek naar verwachting maximaal is (6 tot 14 weken na vaccinatie) en nogmaals ongeveer een half jaar na

vaccinatie. Hiervoor zal bloed worden afgenomen bij de resusbaby's, die hiervoor licht gesedeerd zullen worden.

Op het moment dat de baby's gevaccineerd worden en als bloed wordt afgenomen, zullen ook anus- en mondswaps worden afgenomen om mogelijke effecten van vaccinatie op het microbioom te bestuderen.

Bij de moeders van baby's die met BCG worden gevaccineerd, zal dus driemaal sedatie nodig zijn en bij de moeders van de controle baby's tweemaal. Er zullen verder geen experimentele handelingen op de moederdieren worden gedaan.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Voor de TB boosterevaluatie en infectiestudies zal een powercalculatie worden gedaan om de groepsgrootte te berekenen op basis van eerdere resultaten in vergelijkbare studies. Afhankelijk van de te testen hypothese en het verwachte effect ligt het aantal dieren per groep meestal tussen de 6 tot 10 dieren per groep. De verwachting is dat cohorten van 2 tot 3 geboortejaren samen gebruikt worden in 1 studie om een aantal booster vaccinatie strategieën naast elkaar te kunnen testen en een positieve en een negatieve controlegroep te kunnen includeren.

Door gedurende 5 jaar 20 tot 30 resusbaby's per jaar te vaccineren, zullen meerdere studies uitgevoerd kunnen worden.

Hieruit volgt dat ook 30-40 moederdieren per jaar handelingen zullen ondergaan die moeten worden beschouwd als dierproef.

Resusapen kunnen meerdere jaren achter elkaar elk jaar een baby krijgen. Het totale aantal moederdieren in proef zal daarom lager zijn dan het totale maximale aantal pasgeboren dieren.

## **B. De dieren**

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Resusapen (*Macaca mulatta*), neonataal, M/V, n=200 + reproductieve moederdieren n<200 (naar verwachting maximaal 120).

Zowel resusmakaken als Java apen (ook een makaaksoort) worden veel gebruikt in TB onderzoek. Resusapen hebben in het kader van deze studie het voordeel boven Java apen, dat ze een geboorteseizoen kennen. Dat maakt het gemakkelijker het vaccineren en bloeden van dieren in een fokgroep uit te voeren. Neonatale dieren zijn nodig omdat BCG vaccinaties in mensen ook gebeurt bij pasgeboren baby's. Mannetjes en vrouwtjes zullen worden gebruikt. In toekomstige TB booster vaccin en infectie studies zal worden gestratificeerd voor geslacht.

Het gemiddelde aantal benodigde pasgeboren dieren per jaar ligt naar verwachting tussen de 30 en 40 per jaar. Het totale aantal in 5 jaar wordt gesteld op maximaal 200.

Verder worden volwassen vrouwen in de vruchtbare leeftijd uit de fokkolonie van het instituut gebruikt. Het maximum ligt op 200 dieren in 5 jaar, maar is in werkelijkheid lager, zoals hierboven beschreven.

## **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

De gevaccineerde baby's en de cohort-gematchte niet-gevaccineerde controles zullen in principe worden gebruikt in TB boostervaccinevaluatiestudies en dat valt niet onder de definitie van hergebruik. Echter, de dieren die uiteindelijk mogelijk niet in TB booster vaccinatie studies zullen worden gebruikt, kunnen worden hergebruikt in andere dierproeven. De verwachting is echter dat alle dieren in TB boostervaccinevaluatiestudies gebruikt zullen worden en dat er dus geen dieren zullen worden hergebruikt.

De meeste moederdieren in de fok zijn niet eerder gebruikt in dierproeven, maar een enkeling wel. In dat geval is er dus sprake van hergebruik.

Nadat de moederdieren in deze dierproef zijn geweest, is er geen wettelijk bezwaar voor hergebruik daarna. De dieren zijn alleen niet inzetbaar voor experimenten waarvoor zwangerschap een exclusie criterium is. Hergebruik zal plaatsvinden binnen de wettelijke kaders beschreven in art. 1<sup>e</sup> van de Wet op de Dierproeven.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

#### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

##### Vervanging

- Vaccinatie is een immunologisch proces waar tot op heden geen alternatief voor is waarvoor geen levende organismen nodig zijn.
- De keuze voor niet-humane primaten is ingegeven door het feit dat vaccinatieresponsen, alsook een TB infectie in knaagdieren anders verloopt dan in primaten.

##### Verfijning

- De baby blijft tijdens vaccinatie aan het moederdier vastgeklampt zitten. Voor de bloedafname zal een lichte sedatie worden toegepast, maar de baby wordt weer op de moeder geplaatst tijdens het wakker worden.
- Door de moeders te sederen alvorens de biotechnische handelingen bij hun baby's uit te voeren, wordt bij de moeders de stress van deze procedure minimaliseren.

##### Vermindering

- Door moederdieren meerdere malen te hergebruiken, wordt het totale aantal moederdieren verminderd ten opzichte van als voor elk jaar nieuwe moederdieren worden geselecteerd.
- De proefopzet laat geen ruimte voor verdere vermindering van het aantal baby's in de proef. Het is wenselijkheid om meerdere TB vaccin booster strategieën naast elkaar te testen. Om deze neonataal BCG gevaccineerde cohorten beschikbaar te hebben als de dieren volwassen zijn, is het nodig om ze nu te vaccineren in voldoende aantallen.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

De stress bij de moeders door het uitvoeren van de biotechnische handelingen bij de baby's wordt geminimaliseerd door de moederdieren te sederen.

### **Herhaling en duplicering**

#### **E. Herhaling**

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

NVT, dit is geen wettelijk vereist onderzoek.

### **Huisvesting en verzorging**

#### **F. Huisvesting en verzorging**

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

#### **G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest**

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1> Ongerief van het bijkomen van de sedatie

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1> Het bijkomen uit de sedatie kan als onaangenaam worden ervaren.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Sedatie is de gangbare procedure voor het uitvoeren van biotechnische handelingen bij makaken. Onderdeel van de procedure is het monitoren van de dieren totdat ze volledig wakker zijn. De dierenarts wordt geconsulteerd in geval van problemen.

### J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

### K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Voor de baby's wordt het ongerief van vaccinatie en bloedafname onder lichte sedatie beschouwd als mild ongerief. Voor de moederdieren wordt het ongerief van sedatie beschouwd als mild ongerief.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja