



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 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.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.
- | Volgnummer | Titel dierproef |
|------------|---|
| 3 | <i>In vivo</i> karakterisering van malariaparasieten in resusapen met behulp van PET-CT |
- Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.*

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In deze studie wordt de ontwikkeling van leverstadium malaria parasieten in de gastheer zichtbaar gemaakt dmv PET-CT. Met de door ons ontwikkelde *in vitro* leverstadium kweek kunnen we hypnozoieten en ontwikkelende leverstadia volgen in de tijd en de activiteit van geneesmiddelen bestuderen, maar er is nog niets bekend over hoe de ontwikkeling *in vivo* plaats vindt. Dit komt omdat leverstadia "onzichtbaar" zijn en een infectie pas duidelijk is als er bloedstadia verschijnen die makkelijk te meten zijn. Door parasieten te ontwikkelen die te visualiseren zijn met PET-CT (bijlage 1), kunnen we dit doorbreken en een goed vergelijk maken tussen *in vivo* en *in vitro* leverstadia (primaire uitkomst parameter). Niet alleen locatie en kinetiek kunnen bestudeerd worden, maar parasieten kunnen ook uit de lever geïsoleerd worden voor -omics studies die een belangrijke bijdrage leveren aan de identificatie van drug targets *in vivo*. Tevens kan de PET-CT visualisatie gebruikt worden als eindpunt na behandeling met experimentele geneesmiddelen (bijlage 2), waardoor het eindpunt veel eerder bereikt wordt dan met de huidige methode (verfijning).

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.

Parasiet infecties gebeuren d.m.v. i.v. injectie onder sedatie (1x per dier; 10 min.). Kleine bloedafnames gebeuren door een naald prik in het been. Dieren worden getraind om mee te werken aan deze procedure d.m.v. positive reinforcement training, en worden beloond met iets lekkers (ca 10x per dier; 5 min.). Genezing van bloedstadium malaria gebeurt door i.m. injecties met anti-malaria middelen (3 x i.m. injectie; 2 min). Bij gebruik van transgene parasieten krijgen de dieren om de dag pyrimethamine verstoppt in een stukje fruit, om eventueel aanwezige wild type parasieten te doden (3x oraal per dier; 2 min). Aan het eind van de studie wordt de aap radicaal genezen d.m.v. de huidige standaardbehandeling om bloedstadia (5 x i.m. injecties; 2 min.) en leverstadia (orale toediening door drinken uit spuit; 3-7 keer; 2 min.) te doden. PET-CT gebeurt onder anesthesie (max 5x; 30 min na i.v. toediening van tracer). Voor parasiet isolatie uit de lever zal PET worden gecombineerd met foto-akoestische imaging (hierbij wordt een fluorescent label toegevoegd aan de tracer). Hiervoor wordt het dier onder sedatie geëuthanaseerd, wordt de lever geïsoleerd en worden mbv "imaging-guided biopsy" de volgende dag parasieten geïsoleerd voor -omics studies (wanneer de dieren niet meer radioactief zijn). De totale follow-up periode is 100 dagen na infectie (overeenkomend met max 3 reactivaties van hypnozoieten leidend tot 3 relapse bloedstadium infecties)

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

De aantallen dieren die gebruikt worden zijn gebaseerd op het aantal experimenten dat naar verwachting uitgevoerd wordt om de nieuwe PET-CT methode te ontwikkelen/valideren, een goed beeld te krijgen van de *in vivo* leverstadium ontwikkeling van de parasiet en materiaal te verkrijgen voor -omics studies. Het aantal apen zal tot het minimum beperkt worden dat nodig is om de proeven uit te voeren. Er worden in deze bijlage geen groepen dieren met elkaar vergeleken en een power analyse is hier niet van toepassing. Voor moleculaire analyse van gezuiverde parasieten zijn drie onafhankelijke replica's nodig om de data statistisch te kunnen vergelijken.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
3	Macaca mulatta	"purpose bred"	>4 jaar	30	M/V	nee	nvt

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Resusapen zijn een natuurlijke gastheer van <i>Plasmodium cynomolgi</i> malaria parasieten. Wij hebben de infectie met sporozoieten zorgvuldig gekarakteriseerd in termen van wanneer bloedstadium parasieten verschijnen. Hierdoor kunnen we met minimale aantallen controles van de bloedparasitemie toe om de parasitemie vast te stellen en in de lever waargenomen relapses te valideren. Parasitemie wordt gecontroleerd dmv het afnemen van een druppel bloed uit een naald prikje in de kuit.
Herkomst	De resusapen van Indiase afkomst komen uit onze eigen fokkolonie en zijn uitstekend te infecteren met <i>P. cynomolgi</i> sporozoieten, met reproduceerbare infectie patronen.
Levensstadia	<i>P. cynomolgi</i> infecteert jonge en oude dieren even goed. Voor de dieren waaruit <i>in vivo</i> parasieten geïsoleerd gaan worden, zullen dieren geselecteerd worden die niet meer inzetbaar zijn voor andere experimenten ivm leeftijd en/of experimenteel verleden.
Aantal	Met 30 dieren kunnen we de nieuwe PET-CT analyse opzetten en valideren, o.a. door de infectie te manipuleren met verschillende geneesmiddelbehandelingen en het (voorspelde) effect zichtbaar te maken met PET-CT. Zes van deze dieren zullen worden gebruikt om parasieten uit de lever te isoleren, op verschillende tijdstippen.
Geslacht	Er is geen verschil tussen mannen en vrouwen wat betreft <i>P. cynomolgi</i> infectie of parasitemie verloop
Genetisch gewijzigd	-
Stam	-

C. Huisvesting en verzorging

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

Ja

Nee > 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.

D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

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.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Ongerief door bijkomen uit de verdoving
2. Ongerief door PET-CT
3. Ongerief door het herhaaldelijk afnemen van kleine bloedmonsters dmv naaldprik in het been

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. De dieren worden verdoofd tijdens i.v. infectie met parasieten. Soms zijn dieren misselijk na het bijkomen uit de verdoving
2. Bij PET-CT worden de dieren verdoofd, waarna een radioactieve tracer i.v. geïnjecteerd wordt. De PET-CT zelf levert naar verwachting geen ongerief op. De scanprocedure duurt minder dan 1 uur.
3. Dieren worden na infectie regelmatig gecontroleerd op de ontwikkeling van bloedstadium parasieten. Dit gebeurt dmv een kleine bloedafname na een naaldprik in het been. Dit kan mogelijk stress opleveren.

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

1. De dieren worden 16 uur voor sedatie nuchter gehouden, om te voorkomen dat de dieren gaan overgeven bij het ontwaken uit de sedatie. Dieren worden in de gaten gehouden bij het ontwaken en bij problemen wordt de dierenarts geconsulteerd.
2. De dieren worden eerst verdoofd en krijgen vervolgens een lokaal mucosaal ontspanningsmiddel toegediend voor intubatie plaatsvindt. De mechanische ventilatie en geforceerde ademhalingspatronen worden gemonitord en afgestemd op de karakteristieken van ieder dier.
3. Het gebruik van getrainde dieren, als boven beschreven, vermindert de stress (en mogelijk angst) bij de dieren tijdens de handelingen.

E. 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 F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Als een dier onverwacht ernstig ziek wordt met een extreem hoge parasitemie die niet meer op tijd behandeld kan worden, geldt dit als humaan eindpunt.

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

<0.1%

F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Het maximale ongerief wordt geschat op matig voor alle dieren. Dit wordt voornamelijk veroorzaakt door herhaalde sedaties noodzakelijk voor de PET-CT metingen.

G. 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	Door het beperkte gastheer bereik van <i>P. cynomolgi</i> zijn alleen makaak soorten, met name resusapen, te gebruiken voor dit type onderzoek. Er bestaan wel malaria soorten die knaagdieren infecteren, maar die vormen geen hypnozoieten. Deze komen alleen voor bij malaria soorten die mensen en apen infecteren. Om hypnozoieten <i>in vivo</i> (moleculair) te karakteriseren ontwikkelen we een unieke methode om de parasieten in de lever zichtbaar te maken m.b.v. PET-CT en om ze uit de lever te kunnen isoleren. Dit soort onderzoek, gericht op het identificeren/valideren van drug targets in hypnozoieten, kan alleen gebeuren in geïnfecteerde resusapen.
Vermindering	Bij het ontwikkelen van de imaging technologie gebruiken we het minimale aantal geïnfecteerde dieren om zinvolle data te krijgen. Dit zullen veelal 2 dieren per experiment zijn. Voor de moleculaire analyse van gezuiverde parasieten zijn 3 onafhankelijke replica nodig en zullen dus 3 dieren per tijdstip gebruikt worden.
Verfijning	We maken gebruik van getrainde dieren, die vrijwillig hun been aanbieden voor i.m. injecties en kuitprikjes, en die getraind zijn in het drinken uit een spuit voor geneesmiddelen toediening. De training gebeurt d.m.v. 'positive reinforcement' en de dieren krijgen een beloning na de handeling. Dit vermindert stress bij de dieren. Omdat we nu voor het eerst parasiet activiteit in de lever kunnen zien, weten we wanneer hypnozoieten reacteren en kunnen we de kuitprikjes daarop aanpassen en tot een minimum beperken. Er wordt cameratoezicht gebruikt bij PET-CT studies om eventuele onverwachte complicaties na de scans bij de dieren snel waar te kunnen nemen en in te kunnen grijpen.

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

P. cynomolgi is een klasse 2 organisme dat ook mensen kan infecteren en experimenten met deze parasiet gebeuren onder inperkingsniveau 2. De productie van transgene parasieten is door de COGEM ingeschaald op inperkingsniveau 2 (DMII en MLII). Geïnfecteerde muggen worden gehanteerd in een speciaal ingericht muggen laboratorium, waarbij de werk protocollen toegespitst zijn op het voorkomen van ontsnappen van malariamuggen. Voor zover bekend zijn er in Nederland geen muggen populaties die transmissie kunnen veroorzaken van *P. cynomolgi*.

H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

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

Dieren die zullen worden gebruikt in de experimenten, zijn mogelijk gebruikt in eerdere studies. Gezien de lange levensduur van deze species zal hergebruik plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in art. 1^e van de Wet op de Dierproeven. In geval van eerder gebruik in malaria studies, moet een voorafgaande malaria infectie minimaal 6 maanden geleden zijn uitgevoerd, om zo min mogelijk last te hebben van ontwikkelende immuniteit tegen malariaparasieten. Voor de experimenten waarbij de dieren geëuthanaseerd worden om leverparasieten te isoleren, zullen dieren geselecteerd worden die niet meer inzetbaar zijn voor andere experimenten i.v.m leeftijd en/of experimenteel verleden.

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

Nee

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

I. Herhaling

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

Niet van toepassing

J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

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 K.

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?

K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

De dieren worden met standaard antimalariamiddelen behandeld (chloroquine of andere standaard antimalariamiddelen voor bloedstadia en primaquine of tafenoquine voor hypnozoïten) en gaan, na bevestiging dat de behandeling succesvol was, terug naar de experimentele voorraad.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Bij een aantal dieren vindt leverresectie plaats na euthanasie om leverstadium parasieten te isoleren voor moleculaire analyse.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Euthanasie vindt plaats d.m.v. ketamine injectie om de dieren te verdoven, gevolgd door een i.v. toegediende overdosis aan barbituraat.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.