



## 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of neem telefonisch contact op (0800-789 0789).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 

50200
-------
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 

Biomedical Primate Research Centre (BPRC)
---
- 1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.
- | Volgnummer | Titel dierproef   |
|------------|---|
| 01         | Bestudering van werkzaamheid en/of werking van nieuwe vaccinatiestrategieën tegen tuberculose |
- 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.

De voorgenomen tuberculosestudies in makaken - resusapen en Java-ape - richten zich primair op de bestudering van de werkzaamheid van nieuwe, preventieve behandelmethodes tegen TB op basis van vaccinatie. Omdat er geen eenduidige biomerkers zijn van beschermende vaccinatie, impliceren deze studies dat de dieren aan een experimentele infectie met *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) moeten worden blootgesteld om proefondervindelijk werkzaamheid vast te stellen.

Werkzaamheid wordt, afhankelijk van de specifieke doelstelling, afgelezen ten opzichte van een niet-behandelde controlegroep, een groep die een standaard controleregime heeft ondergaan, bijvoorbeeld intradermale BCG-immunisatie, of beide.

De primaire uitkomst van experimentele TB, en daarmee impliciet het effect van preventieve behandeling, berust op de registratie van TB-pathologie en ziekte. Een andere belangrijke uitkomstmaat berust op bacteriologie en betreft het vaststellen van de mate van kolonisatie en replicatie van *M. tuberculosis* in specifieke weefsels. Voor beide uitkomstparameters is het nodig dat dieren op het vooraf, per protocol vastgestelde eindpunt op humane wijze worden gedood.

Pathologie wordt semi-kwantitatief gescoord aan de hand van een gestandaardiseerd protocol dat aard, aantal en/of omvang van laesies in weefsels verdisconteert. (Dijkman et al., 2019a; Lin et al., 2009; Maiello et al., 2018) Uit de aard van de experimentele, endobronchiale infectie wordt een onderscheid gemaakt tussen primaire infectie van de betreffende longkwab en disseminatie (verspreiding) van ziekte naar overige gebieden in de long, naar de long-drainerende lymfeknopen, of naar extrathoracale locaties als milt, lever of nieren. Naast de aanwezigheid van laesies, worden ook andere TB-kenmerkende manifestaties geregistreerd, als cavitatie, pleurale adhesie e.d. Deze pathologiescore is dus gebaseerd op macroscopische waarneming. Daarnaast

worden monsters van met name long en long-drainerende lymfeklieren veiliggesteld (al dan niet door fixatie en/of cryo-conservatie) voor eventueel aanvullend histologisch of ander weefsel-geassocieerd onderzoek.

De mate van replicatie van *M. tuberculosis*, of de steriliserende werking van behandeling, wordt gemeten aan de hand van tellingen van het aantal kolonievormende eenheden na homogenisatie, seriële verdunning en het uitplaten van weefselmonsters op selectief kweekmedium. Ook de bacteriologie wordt beschreven als primaire en secundaire infectie, op basis van de eerdergenoemde oorsprong van het weefselmonster ten opzichte van de endobronchiale instillatie.

Naast deze eindpuntmetingen wordt TB-ziekteontwikkeling gevolgd met beeldvormende technieken. Daartoe is een geïntegreerde PET-CT scanner beschikbaar waarmee anatomische (CT) en functionele afwijkingen (PET) als gevolg van de experimentele infectie worden geregistreerd. Voor PET diagnostiek wordt binnen het TB-veld routinematig gelabeld fluorodeoxyglucose (FDG) als *tracer* gebruikt om infectie-geassocieerde ontsteking te meten. Andersoortige tracers kunnen in de toekomst wellicht het experimentele TB-onderzoek onder dit project verdiepen.

Net als in de mens, kan progressieve TB in makaken gepaard gaan met gewichtsverlies en significante afwijkingen in het hematologisch en klinisch-chemisch bloedbeeld. (Verreck et al., 2009) Met de recente verfijningen in ons model hebben we moeten vaststellen dat robuuste klinische afwijkingen met statistische significantie zelden of nooit meer optreden. Hematologie en klinische chemie worden daarom nog slechts beperkt aan het studieprotocol toegevoegd. Gewichtsregistratie, echter, is nog steeds een standaard onderdeel en dient (uiteeraard naast dagelijkse observatie van gedrag) als monitor van onverwacht overmatig ongerief.

Tot slot, experimentele blootstelling aan *M. tuberculosis* leidt in niet-behandelde makaken tot een oplopend signaal van afweer dat in de bloedbaan te meten valt, bijvoorbeeld aan de hand van de eerdergenoemde IFN $\gamma$  (IGRA) respons. Het monitoren van antigeen-specifieke afweer (kwalitatief en/of kwantitatief) in de fase na experimentele blootstelling is doorgaans een geïntegreerd onderdeel van het studieprotocol dat eveneens informatie verschaft over de werkzaamheid.

Naast werkzaamheid (*efficacy*), wordt de werking bestudeerd aan de hand van de zich ontwikkelende immuunrespons, voorafgaand aan de infectieuze blootstelling. Op basis van het huidige inzicht wordt doorgaans van een experimenteel TB-vaccin of vaccinatieregime verwacht dat het een cellulair adaptieve immuunrespons induceert. Vaak dient een vaccin-specifiek IGRA-signaal als bevestiging van succesvolle vaccinatie. Cytometrie biedt een krachtig platform om diverse celsubsets immuun-fenotypisch te bestuderen. Maar ook andere karakteristieken - zoals humorale of zogeheten aangeboren afweerparameters - kunnen een expliciet onderdeel van vraagstelling en onderzoeksprotocol vormen. Omdat het TB-vaccinonderzoeksveld een éénduidig correlaat van beschermende vaccinatie ontbeert, is dit immunologisch onderzoek exploratief van aard en heeft tot doel diepere kennis te verwerven en mogelijke correlaten (biomerkers) te identificeren van vaccin-geïnduceerde TB-immuniteit. Veelal hanteren we een hypothese-gedreven aanpak in ons onderliggende immunologisch onderzoek, maar waar mogelijk zullen we ook bemonstering opnemen met het oog op hypothese-genererende, zogeheten *omics* technieken. Denk daarbij bijvoorbeeld aan serum, longspoelvoelstof of volbloed RNA.

Als eerder gesteld, is veelal het vaststellen van werkzaamheid het bovenliggende doel van een vaccinstudie in makaken en is infectieuze blootstelling het logische vervolg na vaccinatie. Soms, echter, beperkt de vraagstelling zich tot het onderzoeken van immunogeniteit per se. Dit is bijvoorbeeld het geval als het onderzoek aan nieuwe, experimentele formuleringen en/of doseringen van een TB-vaccin betreft. Voorbij het bestuderen van de geheugenfunctie van het immuunsysteem aan de hand van bloedcellen, zal nadrukkelijk ook de lokale immuniteit in specifieke weefsels kunnen worden onderzocht. Denk hierbij bijvoorbeeld aan de longen - al dan niet na pulmonaire vaccinatie - of injectieplaats-drainerende lymfeknopen. In al deze gevallen zal de primaire uitkomstparameter worden gedefinieerd aan de hand van een immunologische grootheid van de gastheerrespons. (Dijkman et al., 2021; Vierboom et al., 2021)

---

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.

We gebruiken *M. tuberculosis* stam Erdman in onze gestandaardiseerde protocollen, en pulmonaire besmetting door gerichte, endobronchiale instillatie met behulp van een bronchoscoop. Erdman is virulent in resusapen en biedt een stringente testconditie met een voldoende dynamisch bereik om werkzaamheid van behandeling te kunnen meten. (Laddy et al., 2018)

---

Wij hanteren een tweetal protocollen voor experimentele pulmonaire *M. tuberculosis* infectie. De eerste is een zogeheten *single low dose* (SLD) infectiemodel. Hierbij wordt een eenmalige blootstelling aan 5 tot 25 kolonievormende eenheden (*colony forming units*, CFU) door endobronchiale instillatie bewerkstelligd. De endobronchiale instillatie is robuust en de procedure op zichzelf wordt goed verdragen. Met deze SLD-blootstelling bereiken we een infectiegraad van 100% in onbehandelde dieren. In niet-behandelde resusapen resulteert deze manier van blootstelling in een progressieve ziekteontwikkeling, zodanig dat een gefixeerd eindpunt van de studie op 10 tot 16 weken na infectieuze blootstelling voldoende is om een effect van preventieve vaccinbehandeling door middel van *post mortem* evaluaties (zie verderop) vast te stellen. In Java-aperen is het ziekteverloop doorgaans milder en zal een langere vervolgperiode tot 8 maanden na infectie worden gehanteerd. Naast SLD gebruiken we ook een zogeheten *repeated limiting dose* (RLD) infectiemodel. Hierbij realiseren we herhaalde, achtvoudige, wekelijkse blootstelling aan gemiddeld één enkele kolonievormende eenheid via endobronchiale instillatie. Hiermee wordt de infectie een stochastisch proces, zowel in resus- als Java-aperen. (Dijkman et al., 2019a; Dijkman et al., 2019b; Vierboom, 2022) Bij wekelijkse blootstelling wordt pas na enkele rondes een infectiegraad van 100% in niet-behandelde controles bereikt. Dit biedt de mogelijkheid om - naast preventie van ziekte - preventie van infectiesignalen te meten. Daartoe zal tijdens de infectiefase wekelijks een bloedmonster voor zogeheten IGRA-diagnostiek worden genomen.

Vooralsnog hebben we in RLD-infectiestudies een korte vervolgperiode van 4 tot 5 weken na de laatste van de herhaalde blootstellingen gehanteerd. In de toekomst, echter, zullen we ook langere vervolgperiodes van 3 tot 6 maanden hanteren om de stabiliteit van het beschermde fenotype dat we na (pulmonaire BCG) vaccinatie en RLD-infectie kunnen krijgen, te onderzoeken. Bij aanhoudende stabiliteit - dat wil zeggen, aanhoudende (paucobacillaire) infectie en lage of ontbrekende immuundiagnostische signalen - hebben we ogenschijnlijk een model voor bestudering van latente, sluimerende TB-infectie in handen. Daarmee zouden we niet alleen een andere, klinisch relevante conditie nabootsen, maar tevens ook in de gelegenheid verkeren om de factoren te bestuderen die een rol spelen bij het doorbreken van wat in eerste instantie als een controlerende immuunrespons wordt waargenomen.

Van elk experiment worden relevante monsters genomen voor aanvullend onderzoek en bewaard voor eventuele retrospectieve analyses. Naast bemonstering van weefsels op eindpunt (*post mortem*) betreft het hier de verzameling van bloedcellen, serum, plasma, longspoelvoelstof en -cellen, volbloed RNA, en beenmerg gedurende de post-infectie- en post-vaccinatiefase. (Dijkman et al., 2021; Dijkman et al., 2019a; Vierboom et al., 2021) Bloedafnames zullen tijdens de vaccinatiefase gemiddeld maximaal 1x per 2 weken plaatsvinden; bij RLD-blootstelling in de infectiefase, als hierboven gesteld, 1x per week. Longspoelingen zullen niet vaker dan gemiddeld 1x per 3 weken plaatsvinden, en beenmergbemonstering niet vaker dan 3x gedurende een hele studie. Bij parenterale vaccinatiestrategieën kan eenmalig een zogeheten tuberculine huidtest (Mantoux) worden toegepast al dan niet gevolgd door huidbiopsie, of eenmalig een (axillaire of inguinale) lymfeknoop worden uitgenomen voor de bestudering van de zich ontwikkelende adaptieve response in lymfoïde weefsel.

Ten aanzien van TB-vaccinstudies zijn diverse immunisatieschema's en daarmee diverse tijdspannes te voorzien. Een enkelvoudige vaccinatie zal doorgaans minimaal 12 weken (3 maanden) worden vervolgd. Meervoudige (booster) vaccinaties, tot 3x maximaal, impliceren intervallen die 1 tot 3 maanden of zelfs periodes tot 1 jaar kunnen bestrijken, met navenant een langere studietijd tot gevolg. Als belangrijk uitgangspunt voor werkzaamheidsstudies hanteren we een minimaal interval van 9 weken (2 maanden) tussen de laatste (booster) immunisatie en de experimentele infectie.

Traditioneel worden intradermale of intramusculaire vaccin-injecties onderzocht die 1 tot 3x worden toegediend. Recent hebben wij en anderen aangetoond hoe eenmalige alternatieve toediening van het beschikbare BCG-vaccin via intraveneuze injectie of via respiratoir mucosale toediening tot sterkere beschermingseffecten in resusapen leidt. (Darrach et al., 2020; Dijkman et al., 2019a) Enerzijds zal dit onderzoek vervolg vinden in een translationeel, toegepast raamwerk, als opmaat voor alternatieve toediening van BCG in de kliniek. Anderzijds zal de grotere beschermende werkzaamheid van vaccinatie via alternatieve routes (intraveneus of mucosaal) dienen als positieve controle in het onderhavige model, om zodoende mechanismen en correlaten van vaccin-geïnduceerde bescherming tegen TB te kunnen identificeren.

---

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

---

Als hierboven aangehaald en ook in het Projectvoorstel beschreven, wordt werkzaamheid afgelezen ten opzichte van onbehandelde controles en/of een standaard vaccinatie met intradermaal BCG. Op grond van onze

ervaringen blijkt het onderhavige (uiteelt-)model voor studies naar de werkzaamheid van TB-vaccinatie niet geschikt om te leunen op historische controles (zie Projectvoorstel). Voor immunogeniteitstudies, echter, is een controlegroep niet per se noodzakelijk (maar mogelijk wel gewenst), omdat de inductie van een gastheerrespons tegen de basale aanvangswaardes kan worden afgemeten.

Door literatuuronderzoek en geholpen door onze betrokkenheid in globale netwerken van TB-onderzoek (als nader beschreven in het Projectvoorstel) zullen wij onnodige duplicatie van studies voorkomen. Waar mogelijk zullen wij studies zodanig ontwerpen dat door het delen van controlegroepen het gebruik van dieren wordt geminimaliseerd.

In de voorgestelde studies zal het aantal te gebruiken dieren inclusief groepsgroottes, per experiment worden gemotiveerd op grond van de doelstelling. Voor de statistische onderbouwing van de voorgestelde groepsgroottes in ons onderzoek hanteren we in de regel een grens van 20% ( $\beta = 0,2$ ) voor de kans om een waarachtig verschil of behandelings-effect te missen (een zogeheten type 2 fout). Aldus stellen we de statistische *power* op 80%. De grens voor de kans om onterecht een verschil of behandelings-effect te duiden waar het slechts een toevallige bevinding betreft (een zogeheten type 1 fout), stellen we doorgaans op 5% ( $\alpha = 0,05$ ). Verder zullen we, waar mogelijk, gebruik maken de spreiding in uitkomstmaten uit eerdere experimenten voor onze statistische onderbouwing.

Gestaafd door onze ervaring, is voor werkzaamheidsanalyses een minimale groepsgrootte van acht dieren gewenst. Uitgaande van het niet-parametrische karakter van TB-pathologie scores, een t-verdeling van uitkomsten, en Pittman's (*asymptotic relative efficiency*), stelt een groepsgrootte van  $n=8$ , onder de voornoemde aannames voor  $\alpha=0,05$  en  $\beta=0,2$ , ons in elk geval in staat om een behandelings-effect groter dan ruim anderhalf maal (1.6x) de standaarddeviatie, als statistisch significant te duiden.

In voorkomende gevallen zal voor werkzaamheidsstudies een verkennende voorstudie worden voorgesteld als prelude op een eventueel groter op te zetten experiment. Een minimale groepsgrootte van  $n=3$  stelt in elk geval in staat om de mediane waarneming als puntschatter te duiden, onafhankelijk van een mogelijke uitschieter. Dergelijke pilootstudies kunnen zich bijvoorbeeld richten op het vinden van een optimale dosering/formulering van een vaccin of op het verkrijgen van proof-of-concept en/of een puntschatter voor werkzaamheid van een bepaalde vaccinatiestrategie.

Voor immunogeniteitstudies is een minimale groepsgrootte van  $n=4$  gewenst, waarbij met behulp van een gepaarde t-toets van meetwaarden vóór en ná immunisatie een significant vaccineffect kan worden vastgesteld als het groter is dan ruim tweemaal (2.1x) de standaarddeviatie. Voor vergelijkende immunogeniteitsstudies zullen grotere groepsgroottes navenant met een statistische berekening worden gemotiveerd.

## 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
01	M. mulatta	eigen fok	volwassen	240	man/vrouw	nee	nvt
01	M. fascicularis	eigen fok	volwassen	60	man/vrouw	nee	nvt

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	<i>Macaca mulatta</i> (resusaap), en <i>Macaca fascicularis</i> (Java-aap) Beide niet-menselijke primateesoorten zijn in meer of mindere mate beschreven als model voor TB-studies. Ze zijn van nature gevoelig voor infectie met <i>M. tuberculosis</i> . En zoals hierboven beschreven, zijn resusapen in zijn algemeenheid gevoeliger voor TB-ziekteontwikkeling dan Java apen (maar, er is fenotypische overlap, en er zijn uitzonderingen op basis van genotypen). Waar resusapen over het algemeen meer geschikt lijken voor werkzaamheidsevaluaties, bijvoorbeeld van preventieve vaccinatie, genieten Java apen de voorkeur als een milder en langzamer ziekteverloop, en mogelijke latente manifestatie relevant is voor de vraagstelling.
Herkomst	De dieren zullen afkomstig zijn van de zelf-voorzienende fokkolonies. (Indien nodig en bij uitzondering kan worden besloten om dieren te betrekken van een erkend importeur.)
Levensstadia	Volwassen dieren voldoen en passen bij de doelstelling.

Aantal	Naar schatting 240 resusapen en 60 Java-apen.
Geslacht	Mannelijk en vrouwelijk.
Genetisch gewijzigd	Nee
Stam	Niet van toepassing.

### 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.

Het optreden van pijn valt niet volledig uit te sluiten. Zo kan bijvoorbeeld de injectie van een vaccin, als gevolg van de ontstekingsbevorderende (adjuvans) werking van een vaccinformulering, tijdelijke irritatie en lichte pijn veroorzaken. Vanwege deze reactie als onderdeel van het vaccin-werkingsmechanisme, is het niet gewenst noch nodig zo'n reactie te antagoneren. Pijn kan ook optreden na beenmergaspiratie, waarvoor pijnbestrijding protocolair is voorzien.

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

In geval van bemonstering van beenmerg door middel van aspiratie van het bovenarmsbot of in geval van huidbiopsie ter nadere bestudering van een diagnostische, tuberculine-huidreactie (Mantoux test), is pijnbestrijding expliciet geïndiceerd. In voorkomende gevallen wordt buprenorfine, 3x daags 0.02 mg/kg intramusculair, voor 3 opeenvolgende dagen vanaf de beenmergpunctie en voor 1 dag na huidbiopsie gedoseerd.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- Sufheid, desoriëntatie en misselijkheid
- Adverse vaccinreacties
- Ziekte, i.c. tuberculose
- In uitzonderlijke gevallen, tijdelijke solitaire huisvesting.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- Sufheid, desoriëntatie en misselijkheid ten gevolge van sedatie. Gelijk aan de klinische ervaring, kunnen we veronderstellen dat makaken enig ongerief kunnen ervaren als ze herstellen van sedatie die is voorgeschreven bij handelingen.
- Adverse vaccinreacties. Eveneens gelijk aan de klinische ervaring, kunnen bijverschijnselen optreden na immunisatie, en met name als gevolg van de ontstekingsstimulerende (adjuvans) werking van hulpstoffen in de formulering. Zo vertonen makaken vaak, net als mensen, een zelflimiterende huid-laesie na standaard intradermale BCG-vaccinatie of toediening van bepaalde virale vectoren als vaccin-drager.

- Ziekte ten gevolge van experimentele (pulmonaire) infectie, i.c. tuberculose. Tuberculose in primaten, althans in progressieve stadia, manifesteert zich in longontsteking en gewichtsverlies. Naast een verminderde respiratoire functie kunnen zieke dieren verminderde eetlust en alertheid tonen.
- Tijdelijke solitaire huisvesting kan als uitzonderlijke situatie optreden wanneer een kooimaat een humaan eindpunt bereikt. [Deze solitaire huisvesting zal in voorkomende gevallen 1 tot 4 maanden kunnen duren.](#)

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

- De bijwerkingen van sedatie worden niet geantagoneerd, maar dieren worden vanaf de namiddag die voorafgaat aan de dag van de handeling nuchter gehouden om braken en mogelijke aspiratie te voorkomen.
- Ofschoon de kans op ongewenste schade als bijwerking van vaccinatie zeer zelden en onwaarschijnlijk is omdat nieuwe formuleringen doorgaans al in een andere diersoort of in de mens zijn beproefd, zal in onvoorziene gevallen een veterinaire arts om een passende behandeling worden gevraagd.
- De recente verfijning van het TB-infectiemodel door lage of herhaald limiterende *M. tuberculosis* dosering (SLD en RLD, respectievelijk) maakt dat zeer progressieve stadia van TB zeldzaam zijn. Bij aanhoudend verlies van eetlust en mogelijk gewichtsverlies zal het dieet worden verrijkt met extra smakelijke en calorierijke bestanddelen. Voorts zijn humane eindpunten geïndiceerd; zie hieronder, onder **E**.

## 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.

Ziekte ten gevolge van experimentele infectie met *M. tuberculosis* kan progressief verlopen. Om overmatig ongerief te voorkomen, gelden de volgende criteria. Bij een gewichtsverlies van meer dan 20% ten opzichte van het piek-gewicht na de start van de infectiefase, of bij gewichtsverlies van meer dan 10% bij 2 opeenvolgende wegingen met minimaal 4-wekelijkse frequentie, zal een veterinaire arts over de conditie van het betreffende dier worden geconsulteerd. Als ook andere parameters zoals veranderde ademhaling, PET-CT beeld en/of klinische bloedwaarden de ernst van de conditie bevestigen, is een humaan eindpunt geïndiceerd. Ook zonder gewichtsverlies kunnen observationele parameters als verminderde respiratoire functie en aanhoudend verminderde eetlust een indicatie zijn voor een humaan eindpunt. Mocht onverhoopt ernstige ziekte optreden met mogelijke symptomen als apathie, bloed ophoesten of dyspneu, dan wordt direct geëuthanaseerd.

In alle gevallen van een humaan eindpunt zal een eindpuntevaluatie met uitgebreide pathologische analyse worden uitgevoerd. Hiermee blijft de waarde van het dier voor de uitkomst van het experiment normaliter behouden.

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

Op basis van onze ervaring wordt een humaan eindpunt in de voorgenomen proeven slechts sporadisch bereikt, in minder dan 5% van de onbehandelde, meest ziektegevoelige resusapen. Voor Java-apen is onze ervaring gering, maar lijkt mede op grond van literatuur de kans op een voortijdig humaan eindpunt nihil.

## 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.

Licht ongerief als misselijkheid en tijdelijke desoriëntatie zal in alle dieren kortstondig optreden op grond van handelingen onder sedatie.

Immunogeniteitsstudies uitgezonderd, zal matig ongerief ten gevolge van tuberculose na experimentele infectie in alle dieren optreden.

Aldus verwachten we voor alle dieren, ook die in immunogeniteitsevaluaties op grond van het aantal handelingen tijdens zo'n studie, een cumulatieve ongeriefsscore van matig.

## 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	<p>De interacties tussen <i>M. tuberculosis</i> en zijn gastheer zijn divers en complex van aard. En dat geldt in het bijzonder ook voor de multi-factoriële, multi-compartimentele afweer van de gastheer die zich, al dan niet onder invloed van een preventieve vaccinatie, ontwikkelt. Voor de gespecificeerde doelstellingen is dergelijke intrinsieke complexiteit niet afdoende met diervrije alternatieven na te bootsen.</p> <p>Stringente ethische en regulatoire regels evenals de limiterende capaciteit voor de klinische evaluatie van nieuwe TB-vaccins, maken pre-klinische dierstudies naar werking en werkzaamheid noodzakelijk. Zij dienen als een risico-beperkend en selectief instrument, als 'poortwachter', om het risico op klinisch falen zoveel mogelijk te beperken. Sociaal en/of genetisch minder complexe diersoorten dan makaken zijn beschikbaar en gangbaar in tuberculoseonderzoek. Maar voor translationele doeleinden en waar relevant ook meer fundamentele/mechanistische vraagstellingen, is het gebruik daarvan soms ontoereikend of ongeschikt. Bij gebrek aan formele validatie van de voorspellende waarde van welke diersoort dan ook, wordt het fylogenetische en relatief grote translationele gat tussen bijvoorbeeld knaagdier en mens vaak gedicht met doelgerichte, aanvullende studies in makaken. Ten aanzien van diverse aspecten is geen andere diersoort ter beschikking die TB en het menselijk afweersysteem zo dicht benadert. Soms ook is, op grond van een verondersteld werkingsmechanisme van vaccin-geïnduceerde immuniteit, een andere, sociaal minder complexe diersoort als een knaagdier, onbruikbaar. Fylogenetisch verwante makaken bieden dan vaak uitkomst.</p>
Vermindering	<p>Uit de aard van het ontwikkelingsproces zoals ook hiervoor beschreven, komen alleen de meest veelbelovende kandidaten op basis van het nodige voorwerk voor een studie in makaken in aanmerking. Zodoende wordt het gebruik van deze dieren verminderd.</p> <p>Experimentele infectiestrategieën (de eerdergenoemde SLD- en RLD-blootstellingen) zijn zodanig gekozen dat 100% van de niet-behandelde controles geïnfecteerd raken en TB-specifieke pathologie zullen vertonen. Dit levert een ijkpunt en optimaal een dynamisch bereik op waartegen het effect van experimentele behandeling kan worden afgemeten.</p> <p>Als eerder onder <b>A</b> beschreven, ondersteunen ervaring en statistische overwegingen inclusief een power calculatie, de bepaling van passende groepsgroottes om vraagstellingen te kunnen beantwoorden.</p> <p>Waar mogelijk, worden controlegroepen gedeeld om gebruik van makaken te verminderen. Ongeacht het uitteelt karakter van onze dieren, streven we naar de selectie van zo homogeen mogelijke groepen binnen de grenzen van wat redelijkerwijs haalbaar is. Dieren worden over behandelgroepen gestratificeerd om variatie binnen een enkel experiment en daarmee het gebruik van proefdieren te beperken.</p> <p>Ons werk is voor een groot deel ingebed in grotere, internationale netwerken, en studies worden vaak in samenwerking voorgesteld. Daarmee volgt een studieplan vaak op discussies en/of (onafhankelijke) beoordeling van studievoorstellen vooraf. De netwerken en samenwerkingsverbanden helpen in de selectie van alleen de meest veelbelovende kandidaten voor onderzoek in makaken.</p> <p>Literatuurstudies gaan aan een voorstel vooraf, voor een optimale vraagstelling en om onnodige duplicaties te voorkomen.</p>

	Indien nodig, zal een kleine pilootstudie worden voorgesteld. Hiermee kan haalbaarheid van innovatieve aanpak worden getoetst, of een puntschatter voor behandelings-effect worden verkregen. Als de uitkomst van de pilootstudie daartoe aanleiding geeft, zal pas een grotere (vervolg)studie worden voorbereid.
Verfijning	<p>Ieder experiment heeft per protocol een gefixeerd eindpunt. We ontwerpen onze studies met een zo beperkt mogelijke vervolgperiode, afhankelijk van de doelstelling. Zoals onder <b>A</b> beschreven, zal in veel gevallen enig behandelings-effect binnen 1 tot 6 maanden na de (laatste) experimentele blootstelling kunnen worden afgelezen. Aldus, wordt onnodig ongerief door langer vervolg vermeden.</p> <p>Voor experimentele infectie met <i>M. tuberculosis</i> gebruiken we - hetzij in <i>single low dose</i> (SLD) of in <i>repeated limited dose</i> (RLD) settings, als eerder beschreven onder <b>A</b> - de laagst mogelijke dosis, passend bij de doelstelling van het experiment. Navenant is ziekteprogressie in zijn algemeenheid minder acuut.</p> <p>Als onder <b>E</b> beschreven, humane eindpuntdefinities voorkomen onnodig lijden in gevallen waar ziekte alsnog sterk tot ontwikkeling komt.</p> <p>Handelingen met dieren worden uitsluitend uitgevoerd door personeel dat, naast hun wettelijke bevoegdheid op grond van opleiding, ook door aanvullende training op de werkplek, bekwaam is.</p> <p>Diertrainingen helpen ongerief door stress te beperken en precisie en waarde van waarneming ten aanzien van (afwijkend) diergedrag te vergroten.</p> <p>Dagelijkse interacties en trainingssessies met dierverzorgers zijn onderdeel van het vaste verrijkingprogramma.</p> <p>Bemonstering wordt gelimiteerd door biologische haalbaarheid en ethische wenselijkheid. Zo is het volume van bloedmonsters binnen 4 weken beperkt tot maximaal 1%, relatief ten opzichte van lichaamsgewicht, en tot maximaal 0,7% per bloeding.</p> <p>Bij bemonstering van beenmerg (punctie) of huid (biopsie) wordt protocolair pijnstilling toegepast.</p> <p>Enig surplus aan biomateriaal wordt niet weggegooid, maar opgeslagen als reserve voor onvoorziene falen in een laboratoriumtest of als <i>biobank</i> voor toekomstig retrospectief en aanvullend onderzoek.</p> <p>Waar mogelijk zullen metingen in de tijd worden herhaald om de dynamiek van het ziekteproces vast te leggen, meer informatie per dier te verwerven, en de statistische betrouwbaarheid van waarneming te vergroten. Dat geldt met name voor immuundiagnostiek maar soms ook beeldvorming met behulp van PET en/of CT.</p>

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.

Milieueffecten zijn ingedamd door inperkende maatregelen.

Ten aanzien van het werken met levend *M. tuberculosis*, zijn de wettelijke, biologische maatregelen tot inperking op niveaus DM3 en ML3 voor dieren en dierlijk materiaal, respectievelijk, geïmplementeerd en voldoende om blootstelling in het milieu te vermijden.

Ten aanzien van het werken met straling voor PET-CT diagnostiek, zijn de wettelijke stralingsbeschermingsmaatregelen van kracht.

Ten aanzien van het milieu wordt gehandeld in overeenstemming met de ISO.14001 normering.

## 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.

Gezien de relatief lange levensduur van de onderhavige makaaksoorten is het mogelijk dieren te selecteren die eerder in dierproeven zijn gebruikt. Indien sprake is van hergebruik, zal deze plaats vinden binnen de wettelijke kaders als beschreven in artikel 1 van de Wet op de Dierproeven.

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?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

In ons tuberculoseonderzoek zijn primaire uitkomstmaten gebaseerd op pathologische manifestatie en mycobacteriële replicatie waarvoor specifieke weefsels worden geanalyseerd en bemonsterd. Dat geldt ook voor immunogeniteitstudies wanneer de vraagstelling zich richt op weefsel-specifieke/weefsel-residente afweermechanismen. De nadere bestudering van weefsels is in deze studies onverenigbaar met leven.

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

Toediening overdosis anesthesie, onder sedatie.

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.

Niet van toepassing.

## **References**

- Darrah, P.A., J.J. Zeppa, P. Maiello, J.A. Hackney, M.H. Wadsworth, 2nd, T.K. Hughes, S. Pokkali, P.A. Swanson, 2nd, N.L. Grant, M.A. Rodgers, M. Kamath, C.M. Causgrove, D.J. Laddy, A. Bonavia, D. Casimiro, P.L. Lin, E. Klein, A.G. White, C.A. Scanga, A.K. Shalek, M. Roederer, J.L. Flynn, and R.A. Seder. 2020. Prevention of tuberculosis in macaques after intravenous BCG immunization. *Nature* 577:95-102.
- Dijkman, K., N. Aguilo, C. Boot, S.O. Hofman, C.C. Sombroek, R.A.W. Vervenne, C.H.M. Kocken, D. Marinova, J. Thole, E. Rodriguez, M.P.M. Vierboom, K.G. Haanstra, E. Puentes, C. Martin, and F.A.W. Verreck. 2021. Pulmonary MTBVAC vaccination induces immune signatures previously correlated with prevention of tuberculosis infection. *Cell Rep Med* 2:100187.
- Dijkman, K., C.C. Sombroek, R.A.W. Vervenne, S.O. Hofman, C. Boot, E.J. Remarque, C.H.M. Kocken, T.H.M. Ottenhoff, I. Kondova, M.A. Khayum, K.G. Haanstra, M.P.M. Vierboom, and F.A.W. Verreck. 2019a. Prevention of tuberculosis infection and disease by local BCG in repeatedly exposed rhesus macaques. *Nat Med* 25:255-262.
- Dijkman, K., R.A.W. Vervenne, C.C. Sombroek, C. Boot, S.O. Hofman, K.E. van Meijgaarden, T.H.M. Ottenhoff, C.H.M. Kocken, K.G. Haanstra, M.P.M. Vierboom, and F.A.W. Verreck. 2019b. Disparate Tuberculosis Disease Development in Macaque Species Is Associated With Innate Immunity. *Front Immunol* 10:2479.
- Laddy, D.J., A. Bonavia, W.A. Hanekom, D. Kaushal, A. Williams, M. Roederer, R.A. Seder, S. Sharpe, F.A.W. Verreck, and P.A. Darrah. 2018. Toward Tuberculosis Vaccine Development: Recommendations for Nonhuman Primate Study Design. *Infect Immun* 86:
- Lin, P.L., M. Rodgers, L. Smith, M. Bigbee, A. Myers, C. Bigbee, I. Chiosea, S.V. Capuano, C. Fuhrman, E. Klein, and J.L. Flynn. 2009. Quantitative comparison of active and latent tuberculosis in the cynomolgus macaque model. *Infect Immun* 77:4631-4642.
- Maiello, P., R.M. DiFazio, A.M. Cadena, M.A. Rodgers, P.L. Lin, C.A. Scanga, and J.L. Flynn. 2018. Rhesus Macaques Are More Susceptible to Progressive Tuberculosis than Cynomolgus Macaques: a Quantitative Comparison. *Infect Immun* 86:
- Verreck, F.A., R.A. Vervenne, I. Kondova, K.W. van Kralingen, E.J. Remarque, G. Braskamp, N.M. van der Werff, A. Kersbergen, T.H. Ottenhoff, P.J. Heidt, S.C. Gilbert, B. Gicquel, A.V. Hill, C. Martin, H. McShane, and A.W. Thomas. 2009. MVA.85A boosting of BCG and an attenuated, *phoP* deficient M. tuberculosis vaccine both show protective efficacy against tuberculosis in rhesus macaques. *PLoS One* 4:e5264.
- Vierboom, M.P.M. 2022. manuscript in voorbereiding. In.
- Vierboom, M.P.M., K. Dijkman, C.C. Sombroek, S.O. Hofman, C. Boot, R.A.W. Vervenne, K.G. Haanstra, M. van der Sande, L. van Emst, J. Dominguez-Andres, S. Moorlag, C.H.M. Kocken, J. Thole, E. Rodriguez, E. Puentes, J.H.A. Martens, R. van Crevel, M.G. Netea, N. Aguilo, C. Martin, and F.A.W. Verreck. 2021. Stronger induction of trained immunity by mucosal BCG or MTBVAC vaccination compared to standard intradermal vaccination. *Cell Rep Med* 2:100185.