



## 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          | Het verkrijgen van bloed van makaken |

*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.

Het doel van de dierproef die in deze bijlage wordt beschreven is het verkrijgen van bloed van makaken ten behoeve van *in vitro* onderzoek naar levensbedreigende infectieziekten. Het bloed kan op 2 manieren verkregen worden:

- van dieren die met als doel regelmatig bloedafnames zonder sedatie te kunnen ondergaan, daarvoor een Vascular Access Port (VAP) geïnstalleerd krijgen (1, 2), of
- van dieren waarvan incidenteel bloed zal worden afgenomen onder sedatie, omdat die dieren bepaalde genetische, fysiologische of immunologische kenmerken hebben die noodzakelijk zijn voor het onderzoek aan specifieke infectieziekten en/of geneesmiddelen. Dit is bijvoorbeeld nodig om dieren te selecteren voor latere *in vivo* studies waarmee de beste resultaten verkregen kunnen worden.

Het voordeel van een VAP is dat van dieren regelmatig wat bloed afgenomen kan worden zonder dat de dieren hiervoor verdoofd hoeven te worden. Bovendien voorkomt de VAP dat er steeds een ader aangeprikt moet worden. Uit de literatuur en gegevens van collega's in de VS is bekend dat deze VAPs in makaken gedurende meerdere jaren optimaal bruikbaar blijven zonder problemen te veroorzaken.

In beide gevallen zal de dierenarts in overleg met de kolonimanager dieren selecteren die hiervoor kunnen worden gebruikt.

Voorafgaand aan de implantatie van de VAP, wordt een aantal dieren getraind om mee te werken aan het vrijwillig presenteren van het been. Training gebeurt door middel van Positive Reinforcement Training (PRT). Uit de dieren met gebleken geschiktheid voor het meewerken aan de handeling worden de dieren geselecteerd waarbij de VAP wordt geïnstalleerd conform eerder uitgebreid beschreven en geaccepteerde methoden (1,2). Het slangetje van de VAP wordt in een vene gebracht en gefixeerd. De andere kant, die bestaat uit een kamertje met een doorsteekbare membraan, wordt onderhuids aangebracht op een plaats die dunbehaard is. De installatie van de VAP gebeurt onder anesthesie en postoperatieve analgesie wordt toegepast. Na een herstelperiode kan bloed worden afgenomen bij de dieren via de VAP. Daarbij wordt eerst de infuusvloeistof weggenomen die de vorige keer tot besluit is aangebracht, daarop volgt het bloedmonster en tenslotte wordt het systeem weer opgevuld met infuusvloeistof met daarin antistollingsmiddel. Al deze handelingen worden aseptisch uitgevoerd en het dier wordt telkens beloond voor de medewerking.

Dieren waarbij incidenteel bloed wordt afgenomen, worden gebloed middels een venapunctie onder sedatie. In beide gevallen worden de apen niet gedood en blijven in de kolonie.

Het bloed wordt gebruikt voor verschillende aspecten van het *in vitro* onderzoek, waaronder:

- *In vitro* assays die dierproeven kunnen vervangen of verfijnen of resulteren in vermindering van het benodigde aantal dieren voor *in vivo* studies.
- Inzicht in de werking van immunologische mechanismen in NHP *in vitro*
- Vaststellen van de werkzaamheid en veiligheid van nieuwe teststoffen in NHP en hoe deze zich verhoudt tot de werkzaamheid waardoor gerichter besloten kan worden of en hoe *in vivo* studies opgezet moeten worden.
- Het beter begrijpen van effecten die gevonden worden in *in vivo* experimenten (16).
- Voor het onderhouden van kweken van malariaparasieten (of andere relevante pathogenen) die gebruikt worden voor fundamenteel wetenschappelijk onderzoek en onderzoek naar nieuwe vaccins en antimalariamiddelen voordat deze in relevante apenmodellen verder onderzocht worden.
- Het testen van de geschiktheid van individuele dieren voor de beoogde studie.

#### Referenties

- [1] Graham ML, Rieke EF, Dunning M, Mutch LA, Craig AM, Zolondek EK, et al. A novel alternative placement site and technique for totally implantable vascular access ports in non-human primates. *J Med Primatol.* 2009;38(3):204.
- [2] Mutch LA, Klinker ST, Janecek JJ, Niewinski MN, Lee RMZ, Graham ML. Long-Term Management of Vascular Access Ports in Nonhuman Primates Used in Preclinical Efficacy and Tolerability Studies. *J Invest Surg.* 2018:1.

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.

- Installatie van de VAP is eenmalig. De duur van de periode waarin een VAP gebruikt kan worden lijkt onbegrensd (1, 2). Echter, mocht of de VAP niet meer werken, of een dier is niet langer geschikt om bloed te doneren, dan kan de VAP probleemloos verwijderd worden. Het dier blijft dan in de kolonie.
- **Dieren waarbij een VAP geïnstalleerd wordt kan afhankelijk van de onderzoeksvragen meerdere keren per maand bloed afgenomen worden. De dieren blijven in de kolonie.**
- Dieren waarbij bloed wordt afgenomen onder sedatie zullen eenmalig of enkele keren (max. 4) per jaar bloedafnames ondergaan. Tijdens de recovery van de sedatie zullen de makaken worden gemonitord. De dieren blijven in de kolonie.

- In alle gevallen (met VAP of onder sedatie) zal de totale hoeveelheid afgenomen bloed het maximum van 1% van het lichaamsgewicht per 4 weken (en 0,7% max per bloeding) niet overschrijden.

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

Voor inzicht in de werking van immunologische processen in vergelijking met literatuur of humaan *in vitro* werk, zal op basis van een inschatting van de spreiding tussen de dieren van het te onderzoeken immunologische fenomeen worden bepaald van hoeveel dieren bloed nodig is om een goed beeld te krijgen van het respectievelijke fenomeen. De ervaring leert dan dit, afhankelijk van de exacte vraagstelling, dit maximaal 5 dieren betreft, afhankelijk van de infectieziekte en exacte onderzoeksvraag. Voor het aanhouden van kweken van bijv. malariaparasieten is per afname bloed van 1 dier voldoende, voor het karakteriseren van kruisreactiviteit of effectiviteit van nieuwe stoffen kunnen maximaal 5 dieren nodig zijn om mogelijke variatie aan te kunnen tonen.

Het aantal dieren dat gebruikt wordt om bloed van af te nemen is lager is dan het aantal benodigde bloedafnames voor *in vitro* studies, omdat per dier bloed afgenomen kan worden om meerdere *in vitro* bepalingen uit te voeren en verschillende processen tegelijk mee te kunnen onderzoeken.

De hoeveelheid af te nemen bloed is afhankelijk van de uit te voeren testen en zal steeds onderbouwd worden. De hoeveelheid zal in ieder geval niet het maximum van 1% van het lichaamsgewicht per 4 weken (en 0,7% max per bloeding) niet overschrijden.

## B. De dieren

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

Voor dit project zullen volwassen resusapen (*Macaca mulatta*) en Java-apen (*Macaca fascicularis*) van beide geslachten worden gebruikt. Beide soorten makaken worden in het onderzoeksinstituut gebruikt voor *in vivo* studies en materialen voor *in vitro* testen zijn daarom ook van beide soorten nodig.

Alle dieren zullen afkomstig zijn uit de eigen fok-kolonie.

**Voor de VAP wordt er van uit gegaan dat de dieren gedurende langere tijd in studie zullen zijn, zoals beschreven onder A, en zijn er gedurende de looptijd van de vergunning relatief weinig dieren nodig. Het aantal aanvragen naar dieren met speciale kenmerken is in het verleden gemiddeld rond de 10-20 dieren per jaar geweest, met name resusapen. Gebaseerd op deze eerdere ervaring en verwachtingen zullen in de periode van 5 jaar maximaal 25 resusapen en 15 Java apen een VAP krijgen terwijl voor incidentele bloedingen wordt verwacht dat maximaal 75 resusapen en 35 Java apen nodig zullen zijn. Alle bloedafnames worden vooraf gemeld aan de IvD.**

## 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.

Gezien de lange levensduur van deze apensoorten is het mogelijk dat dieren die zullen worden gebruikt in de dierproeven, gebruikt zijn in eerdere dierproeven. Indien er sprake is van hergebruik, zal dit plaatsvinden binnen de wettelijke kaders zoals beschreven in art. 1<sup>e</sup> van de Wet op de Dierproeven en zoals beschreven in de Toelichting.

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**

Voor de *in vitro* testen is bloed van makaken nodig. De testen worden gebruikt om een aantal gegevens te verkrijgen die nodig zijn voor studies in apenmodellen en die leiden tot verfijning van het model alsmede tot vermindering van het aantal benodigde dieren, het kweken van (aap-specifieke) pathogenen of het verkrijgen van *in vitro* gegevens waardoor bijvoorbeeld de *in vivo* verkregen data beter begrepen kunnen worden. Omdat dit specifieke apenmodellen betreft kunnen deze testen niet opgezet worden met bloed van andere soorten, waaronder de mens.

### **Vermindering**

Voor analyses met het bloed zal door de onderzoekers met statistische analyse op basis van de verwachte spreiding in de individuele parameters onderbouwd worden van hoeveel dieren bloed nodig is om tot een betrouwbaar resultaat te komen. In zo ver mogelijk zal door het gebruik van microassays de benodigde hoeveelheid bloed tot het minimum beperkt worden. Verder zal door het nemen van bloedmonsters voor verschillende doeleinden te combineren, het aantal benodigde bloeddonoren zo klein mogelijk worden gehouden.

### **Verfijning**

Om stress waar mogelijk te vermijden zijn de dieren zijn getraind om in de thuishooi zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken aan invasieve biotechnische handelingen zoals het geven van een verdoving via intramusculaire toediening. De sedativa zullen op basis van lichaamsgewicht van de dieren worden gedoseerd. Het ongerief van het afnemen van bloed wordt voornamelijk veroorzaakt door het ontwaken uit de sedatie. Door het gebruik van een VAP in zeer goed getrainde dieren, wordt dit ongerief voor een zeer groot deel beperkt. De dieren worden telkens beloond (positive reinforcement).

Tijdens de studie zullen de dieren worden geobserveerd. Mochten er veranderingen optreden in gedrag, eetlust, of ontlasting, dan worden de veterinaire en de diertrainer/gedragsdeskundige hiervan op de hoogte gesteld en zullen passende maatregelen genomen worden.

De dieren zullen op gewicht worden gedoseerd qua sedativa.

Zowel bij PRT als bij welzijnsobservaties wordt ook in de vorm van interactie en het aanbieden van verrijking (food en non-food) een zo optimaal mogelijk welzijn van de proefdieren nagestreefd.

Er is veel geïnvesteerd in micro-methodes om zoveel mogelijk informatie te krijgen uit een zo klein mogelijk bloedvolume. Ook wordt ernaar gestreefd om indien geen volbloed nodig is, na de bloedafname plasma, de rode bloedcellen (welke nodig zijn voor malariakweken) en de witte bloedcellen van elkaar te scheiden om in verschillende testen in te gebruiken.

De dieren blijven zo veel mogelijk gehuisvest in groepskooien met vrij toegang tot binnen- en buitenverblijf in de kolonie.

---

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.

invasieve biotechnische handelingen zoals het geven van een verdoving via intramusculaire toediening. De sedativa zullen op basis van lichaamsgewicht van de dieren worden gedoseerd. Bij implantatie van de VAP wordt postoperatieve analgesie gegeven.

Er worden geen nadelige milieueffecten verwacht.

---

## **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

## 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.

Preventieve postoperatieve pijnbestrijding wordt standaard toegepast na implantatie van de VAP. De dieren zullen goed worden geobserveerd. Indien er signalen zijn dat een dier na de standaardperiode niet vrij is van pijn, wordt de periode waarin pijnbestrijding wordt gegeven verlengd. Mochten dieren onverwacht negatief reageren op de VAP (bijv. zelfbijten, krabben) of als er ontstekingen optreden dan zal in overleg met de dierenarts worden besloten de VAP te verwijderen en wordt het dier uit studie genomen, maar wel in de kolonie blijven.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1) Ongerief door het ontwaken uit sedatie.
- 2) Infecties bij implantatie of gebruik van de VAP.

3) Wanneer in het afgenomen bloed afwijkingen worden waargenomen wordt de diagnostiek uitgebreid met oog op de gezondheid van het dier.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het ontwaken uit sedatie kan een gevoel van desoriëntatie geven.  
Bij een implantaat kan een eventuele lokale infectie chronisch worden en de diergezondheid aantasten.

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

- 1) Eventuele bijverschijnselen na sedatie kunnen niet worden geantagoneerd. Door de dieren gebaseerd op lichaamsgewicht te sederen wordt de hoeveelheid gebruikte sedatie middel zo laag mogelijk gehouden. De dieren worden 16-18 uur voor aanvang van de procedure nuchter gehouden om te voorkomen dat ze overgeven en aspireren na sedatie.
- 2) Eventuele infecties zullen worden behandeld met antibiotica en, als dat onvoldoende effect heeft, wordt de VAP verwijderd. In het algemeen verdwijnt dan de ontsteking.

#### 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.

Dergelijke omstandigheden worden niet voorzien maar bij problemen met diergezondheid of dierenwelzijn die voortduren wordt het betreffende dier uit de proef genomen. Het dier wordt dan uit proef genomen en, afhankelijk van het advies van de dierenarts wordt het dier behandeld en wordt indien nodig een eventuele VAP verwijderd. Het dier wordt onder observatie gehouden totdat de situatie is genormaliseerd. Alleen als de dierenarts verwacht dat gezondheid of welzijn niet zullen herstellen wordt het dier om welzijnsredenen gedood.

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

nvt

#### 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.

100% licht

### 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