



## 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          | Testen van een nieuw, mild adjuvant ter vervanging van CFA, in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie |
- 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.

Non-humane primaten (NHP) worden ingezet in diermodellen voor auto-immuun geïnduceerde, neuroinflammatoire aandoeningen (zoals multipale sclerose (MS)). De verzamelnaam voor de experimentele diermodellen voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie is experimentele auto-immuun encephalitis (EAE). Om EAE te induceren wordt een sterk adjuvant gebruikt, compleet Freund's adjuvant (CFA), dat sterke bijwerkingen tot gevolg heeft, met name in de resus makaak.

Gezien de ernstige aard van de CFA-gerelateerde bijwerkingen in de resus makaak is de behoefte aan vervanging van CFA door een ander, milder adjuvant groot. Daarom is er binnen het instituut een *in vitro* onderzoeksprogramma opgezet om nieuwe, mildere adjuvantia te ontwikkelen die minder of geen bijwerkingen hebben maar toch effectief zijn. Een dergelijk adjuvant is nu ontwikkeld, genaamd MiMyc, en *in vivo* in resus makaken getest op afwezigheid van bijwerkingen en aanwezigheid van adjuvantiteit. Dit voorstel richt zich op het uitvoeren van de *proof-of-principle* studies om dit mildere adjuvant te testen in een EAE inductie protocol.

Het uiteindelijke doel van het project is om te testen of MiMyc het gebruik van CFA als adjuvant ter inductie van EAE in resus makaken kan vervangen. Om dit doel te bereiken dient een EAE incidentie van ten minste 80% bereikt te worden, een lagere EAE incidentie leidt tot een sterke toename van de groepsgroottes die nodig zijn voor vergelijkend onderzoek en therapie evaluaties met als gevolg een onbruikbaar diermodel.

Het project is getrap opgebouwd, en zal bestaan uit één of meerdere EAE studies. De **primaire uitkomstparameter** daarbij is EAE incidentie, en daar zijn de studies ook op gepowered (power = 0.8). **Secundaire uitkomstparameters** zijn optredende perifere T en B cel responsen. Tevens wordt de tijd tot het humane eindpunt gescoord (zie EAE score tabellen in paragraaf J). De dieren worden aan het eind van de studie, of wanneer het humane eindpunt bereikt is, geëuthanaseerd. Post mortem wordt dan de ernst van de pathologie in de hersenen en het ruggenmerg geanalyseerd, en in het bloed en de lymfoïde organen wordt de activatie van het immuunsysteem verder onderzocht.

*De hypothese die wij zullen testen is dat de EAE incidentie met MiMyc significant hoger is dan de incidentie verkregen bij immunisatie met incompleet Freund's adjuvant (IFA) – **doel 1**. Leidend bij de experimentele opzet is dat in geen van de experimenten CFA gebruikt zal worden, ook niet als positieve controle, en dat er zo veel mogelijk gebruik gemaakt zal worden van historische controles om het aantal ingezette dieren en het veroorzaakte ongerief tot een minimum te beperken. Het uiteindelijke doel dat wij nastreven is om m.b.v. MiMyc een robuust, bijwerkingsvrij of bijwerkingsarm, EAE inductie protocol (incidentie van minimaal 80%) op te zetten en daarmee CFA overbodig te maken – **doel 2**.*

Het meest frequent gebruikte antigeen voor EAE studies in de resus makaak is myeline oligodendrocyte glycoproteïne (MOG). Dit wordt als recombinant humaan eiwit (rhMOG) of als peptide (pMOG) geformuleerd in verschillende adjuvantia, met verschillende EAE incidenties tot gevolg (zie Tabel 1). In de voorgestelde studie is MOG ook het autoantigeen van keuze.

Antigeen	EAE incidentie		Historische controles voor IFA aanwezig?	Benodigde dier# voor significant verschil t.o.v. IFA	Drempel voor EAE inductie
	IFA	CFA			
pMOG	0%	80%	JA	5	HOOG
rhMOG	40%	100%	NEE	10	LAAG

**Tabel 1.** Historische gegevens over EAE incidenties verkregen met verschillende adjuvantia en verschillende antigenen.

*Referenties:*

1. [Redacted]

5. Kerlero de Rosbo, N. et al. (2000) Rhesus monkeys are highly susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein: characterisation of immunodominant T- and B-cell epitopes. *J Neuroimmunol* 110 (1-2), 83-96.

6. [Redacted]

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.

- Voordat de dieren geïmmuniseerd worden zal er bloed worden afgenomen voor de bepaling van individuele nul waarden van relevante parameters en indien nodig voor het maken van getransformeerde B-cellen (deze kunnen later dienen als antigeen presenterende cellen in eventuele cellulaire *in vitro* assays). Na immunisatie zal wekelijks bloed worden afgenomen voor het bepalen van relevante immuun

parameters (B en T cel responsen). Veranderingen in deze parameters zijn belangrijk om de effectiviteit van MiMyc als adjuvant te kunnen inschatten alsmede om de effecten van booster injecties te bestuderen; wekelijkse meetpunten geven een afdoende resolutie daarvoor. De maximaal toelaatbare bloed volumes worden hierbij in acht genomen.

- De huidige methode om EAE te induceren maakt gebruik van intracutane injecties op de rug met een emulsie, bevattende recombinant humaan myeline oligodendrocyte glycoproteïne (rhMOG) of een MOG peptide (34-56, pMOG) in adjuvant. Indien nodig, wordt deze handeling maandelijks herhaald (met een maximum van vier immunisaties totaal), totdat een dier EAE score 2 heeft ontwikkeld of het einde van de studie is bereikt (maximaal ongeveer 120 dagen).
- Voor wekelijkse bloedafname en gelijktijdige lichaamsgewicht meting worden de dieren gesedeerd, tevens worden dan de inoculatie plaatsen op adjuvant-gerelateerde bijwerkingen gescoord en m.b.v. niet-invasieve infrarood technologie geanalyseerd op onderhuidse ontstekingsactiviteit.
- De klinische score behorend bij EAE wordt dagelijks gemonitord. Daarbij wordt een standaard score systeem gehanteerd waarmee de gradatie van neurologische defecten wordt vastgelegd.

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

Op basis van historische studies is een positieve controle groep (waarbij CFA als adjuvant gebruikt wordt) niet noodzakelijk, en die is dus ook afwezig. Dit brengt het aantal benodigde dieren terug, en beperkt tevens het bijwerkings geassocieerde ongerief. **Om de groepsgroottes te bepalen is de te toetsen werkhypothese (doel 1) dat immunisatie in MiMyc een statistisch significant hogere EAE incidentie tot gevolg heeft ten opzichte van een beperktere incidentie in de groep waarbij IFA als adjuvant gebruikt werd.** Afhankelijk van het gebruikte antigeen (rhMOG of pMOG) leidt dit tot een andere proefopzet en andere groepsgroottes gezien er verschillende EAE incidenties in de IFA controlegroep zijn. Leidend bij iedere proefopzet is de minimale groepsgrootte om tot een significant verschil (en dus een antwoord op de gestelde onderzoeksvraag) te komen, uitgerekend m.b.v. power analyses (=0.8) uitgevoerd op een van te voren ingeschat verschil.

Het vermijden van CFA als positieve controle groep heeft tot gevolg dat onze referentiegroep dus de negatieve controlegroep is (IFA). Wanneer pMOG geformuleerd wordt in IFA dan leidt dat nooit tot EAE. Dit in tegenstelling tot rhMOG formulering in IFA, wat leidt tot een EAE incidentie van 40%. De drempel voor EAE inductie ligt dus lager bij gebruik van rhMOG, wat ook te verwachten is gezien de aanwezigheid van meerdere epitopen die een bijdrage kunnen leveren aan pathogene auto-immunreacties (in tegenstelling tot het pMOG). Daarnaast is bekend is dat de hoeveelheid resterende microbiële verontreiniging in rhMOG van batch-tot-batch kan verschillen, wat ook invloed kan hebben op de EAE incidentie, en wat tevens het meenemen van een historische controlegroep onmogelijk maakt.

Ondanks dat de drempel voor EAE inductie hoger ligt bij gebruik van pMOG en dat de kans op succes dus kleiner is, kiezen wij er toch voor om met dit antigeen te starten in een *pilot* experiment. Gezien de aanwezigheid van een historische negatieve controle groep van 5 dieren, volstaat één groep van 5 dieren om te testen of MiMyc beter pathogene auto-immunresponsen kan helpen induceren dan IFA (zie Tabel 2). Mocht dat niet zo zijn, dan is het aantal ingezette dieren en het ongerief initieel tot een minimum beperkt gebleven. Mochten we wel EAE kunnen induceren m.b.v. MiMyc, dan hangen de vervollexperimenten af van de incidentie.

Adjuvant	Groepsgrootte	#dieren met EAE	Incidentie (95% CI)	Significant tov IFA
IFA	5	0	0% (0 - 43%)	Nvt
MiMyc	5	0	0% (0 - 43%)	Nee
	5	1	20% (4 - 62%)	Nee
	5	2	40% (12 - 77%)	Nee
	5	3	60% (23 - 88%)	Nee
	5	4	80% (38 - 96%)	Ja
	5	5	100% (57 - 100%)	Ja

**Tabel 2.** Doorgerekende uitkomsten en statistische consequenties van immunisatie van pMOG in IFA (historische gegevens) en MiMyc (hypothetische uitkomsten). Fisher's exact test: power = 0.8.

Mocht de EAE incidentie met pMOG in MiMyc 40% of lager zijn, dan is daarmee niet bewezen dat MiMyc significant beter pathogene auto-immuunresponsen kan helpen induceren dan IFA. Wij zullen dan minimaal één vervolggexperiment uitvoeren met rhMOG als antigeen, waarbij in dit geval wel een extra controle groep nodig is. Er zullen dan twee groepen van 10 dieren met rhMOG geïmmuniseerd worden, één groep met rhMOG geformuleerd in IFA en één groep met rhMOG in MiMyc (zie Tabel 3). Uit deze tabel blijkt dat wij alleen bij een 100% EAE incidentie met rhMOG in MiMyc (gelijk aan die van rhMOG in CFA), een significant verschil bereiken t.o.v de ingeschatte 40% incidentie met rhMOG in IFA. Hierbij geldt wel de kanttekening dat er batch-batch verschillen zijn tussen de preparaten rhMOG (zoals al eerder aangegeven) die de daadwerkelijke EAE incidentie in IFA kunnen beïnvloeden, zowel naar boven als beneden, en daarmee ook de criteria voor het bereiken van significante verschillen. Mocht immunisatie met rhMOG in MiMyc niet resulteren in een EAE incidentie van 100%, dan is het experiment daarmee zeker niet mislukt. Wanneer de incidentie 70, 80 of 90% is, dan is de strategie om meer dieren met rhMOG te immuniseren om **doel 2** te behalen (en mogelijk ook door de toename van de groepsgrootte ook **doel 1**). Bij EAE incidenties van 60% of lager is MiMyc niet geschikt om CFA te vervangen.

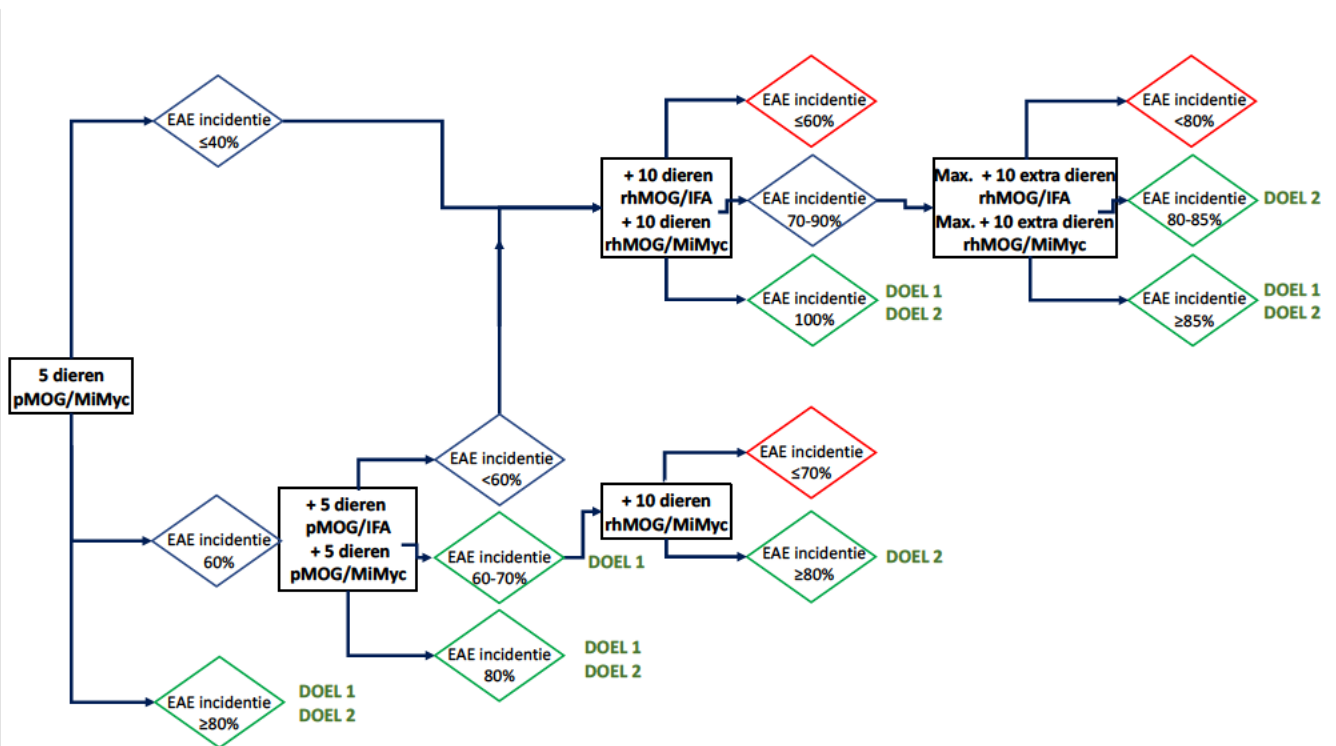
Adjuvant	Groepsgrootte	#dieren met EAE	Incidentie (95% CI)	Significant t.o.v. IFA
<b>IFA</b>	10	4	40% (17 - 69%)	Nvt
<b>MiMyc</b>	10	4	40% (17 - 69%)	Nee
	10	5	50% (24 - 76%)	Nee
	10	6	60% (31 - 83%)	Nee
	10	7	70% (40 - 89%)	Nee
	10	8	80% (49 - 94%)	Nee
	10	9	90% (60 - 98%)	Nee
	10	10	100% (72 - 100%)	Ja

**Tabel 3.** Doorgerekende uitkomsten en statistische consequenties van immunisatie van rhMOG in IFA (voorspelde gegevens op basis van eerdere experimenten) en MiMyc (hypothetische uitkomsten). Fisher's exact test, power = 0.8.

Mocht de EAE incidentie met pMOG in MiMyc 60% zijn, dan is daarmee nog niet bewezen dat MiMyc significant beter pathogene auto-immuunresponsen kan helpen induceren dan IFA, gezien de relatief kleine groepsgroottes. Aangezien het resultaat wel veelbelovend is, zullen we dan nog 5 dieren immuniseren met pMOG in MiMyc en 5 dieren met pMOG in IFA om zo mogelijk wel tot een significant verschil te kunnen komen (**doel 1**). Doorrekening leert dat -bij groepsgroottes van dan 10 dieren die geïmmuniseerd zijn met pMOG in IFA en MiMyc- het verschil significant is vanaf 60% incidentie. Mochten alle 5 de dieren die met MiMyc geïmmuniseerd zijn EAE ontwikkeld hebben, dan zou de incidentie daarmee op 80% komen en **doel 2** ook bereikt zijn. Mocht de incidentie 60 of 70% zijn, dan is doel 1 daarmee behaald, en dan zou voor het behalen van **doel 2** immunisatie van één groep van 10 dieren met rhMOG in MiMyc volstaan om de EAE incidentie te kunnen inschatten (zie Tabel 3). De verwachting is dat de EAE incidentie hoger zal zijn dan bij immunisatie met pMOG, waarmee de kans op een incidentie van minimaal 80% -**doel 2**- zeer reëel is. We zijn ons volledig bewust van het gegeven dat de spreiding met het lage aantal gebruikte dieren groot is (zie Tabel 3 voor spreidingen), maar vertrouwen er op dat wanneer er overgegaan wordt op MiMyc als adjuvant de groepsgrootte zal toenemen doordat in toekomstige experimenten met rhMOG voor andere onderzoeksdoelen CFA vervangen kan worden door MiMyc.

Mocht de EAE incidentie met pMOG in MiMyc 80% of hoger zijn, dan zullen er geen vervolggexperimenten met rhMOG nodig zijn omdat het model met pMOG dan robuust genoeg is voor gebruik en daarmee zowel **doel 1** als **doel 2** behaald zijn. We zijn ons bewust van het gegeven dat de spreiding met het lage aantal gebruikte dieren groot is (zie Tabel 2: in geval van 80%, 38 - 96% en in geval van 100%, 57 - 100%), waar in eerste instantie ook rekening mee gehouden moet worden wanneer nieuwe studies voor bv therapie evaluatie gedaan zouden worden met MiMyc ipv CFA. Maar net zoals het geval is voor rhMOG, zullen deze toekomstige studies ook leiden tot een toename van de groepsgroottes en daarmee tot een afname van de spreiding.

Een flowchart met go/no-go beslis momenten is weergegeven in Figuur 1.



**Figuur 1.** Studie ontwerp en go/no-go beslispunten.

## B. De dieren

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

**Resus makaak (*Macaca mulatta*), n=55 volwassen, M/V.**

**Diersoort:** Resus makaken (*Macaca mulatta*) zijn niet-menselijke primaten die zeer geschikt zijn voor translationeel onderzoek naar acuut verloopende ontstekingsreacties van het brein zoals de acute fases van MS; er kunnen nieuwe therapieën in worden getest maar ze kunnen ook worden gebruikt om het ziekteverloop, de pathologie of de rol van virussen hierin (met name van virussen die slechts primaten infecteren) te onderzoeken.

**Herkomst:** De dieren zullen afkomstig zijn van de eigen fok binnen het instituut waar het experiment wordt uitgevoerd of in uitzonderingsgevallen van een erkende leverancier, waarbij de richtlijnen van de EU zullen worden gevolgd.

**Levensstadia:** De dieren moeten volwassen zijn, zodat ze een goed ontwikkeld immuunsysteem en centraal zenuwstelsel hebben.

**Aantal:** De verwachting is dat er maximaal 4 studies worden gedaan op deze bijlage. Het eerste experiment bestaat uit één groep van 5 dieren. Verdere mogelijke experimenten zullen bestaan uit 1 of 2 groepen, van naar verwachting maximaal 10 dieren per groep. Wij verwachten maximaal 55 resus makaken nodig te hebben.

**Geslacht:** Er is geen verschil aangetoond tussen de sexen in het EAE model. Afhankelijk van de vraagstelling en beschikbaarheid zal er worden gekozen voor een of beide geslachten.

## 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 resus makaken is het mogelijk dat dieren die zullen worden gebruikt in de dierproeven, gebruikt zijn in eerdere dierproeven. Indien sprake is van hergebruik, zal deze plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in art. 1<sup>e</sup> van de Wet op de Dierproeven en zoals beschreven in de Toelichting. Geselecteerde dieren mogen niet behandeld zijn met een product dat kan interfereren met het EAE model.

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:

MiMyc is uitgebreid *in vitro* en *in vivo* (in de resus makaak) getest op zowel bijwerkingen als op adjuvant werking. De voorgestelde experimenten zijn *proof-of-principle* studies om te testen of MiMyc CFA als adjuvant kan vervangen in het resus makaak EAE model.

Helaas is het nog niet mogelijk om op een proefdiervrije manier auto-immuunziekten na te kunnen bootsen. In het geval van ontstekingen van het brein (zoals bij EAE en MS) wordt dit veroorzaakt door complexe interacties tussen het brein en het gehele afweersysteem en zeer waarschijnlijk ook door omgevingsinvloeden en levensstijlen. Bestaande proefdiervrije alternatieven kunnen deze interacties –nog niet nabootsen.

Ook testen in andere diersoorten bieden hier geen uitkomst of extra informatie. Wanneer we zouden besluiten om MiMyc eerst in knaagdiermodellen voor EAE te testen, dan zou -onafhankelijk van de uitkomst van deze proeven- het traject om te testen of MiMyc ook in resus makaken CFA kan vervangen er exact hetzelfde uit zien. *De facto* zou dit dus alleen maar extra dieren kosten.

Vermindering:

Het minimaal benodigd aantal dieren zal worden ingezet om tot statistisch relevante informatie te komen. Daartoe zijn vantevoren powercalculaties uitgevoerd (zie boven). De complete onderzoeksstrategie is getrapd opgebouwd, waarbij begonnen wordt met een *proof-of-principle* studie die een minimaal aantal dieren vereist. De onderzoeksstrategie is zo gekozen dat positieve controlegroepen niet nodig zijn en dat voor de negatieve controlegroepen zoveel mogelijk gebruik gemaakt wordt van historische controles.

Verfijning:

Eén van de belangrijkste doelen van dit voorstel is verfijning. Door het veranderen van het EAE inductie-protocol, verwachten we dat makaken minder granuloma's ontwikkelen op de immunisatie plekken.

Alle dieren worden getraind om te wennen aan de experimentele procedures. Ongerief van inspuitingsplaatsen zal naar verwachting licht zijn. Wanneer nodig zal in overleg met de dierenarts medicatie worden toegepast.

Tijdens de experimenten wordt onnodig ongerief vermeden door het gebruik van sedatie/pijnstilling. We werken met een cumulatieve discomfort schaal (zie paragraaf J) en dieren zullen worden geëuthanaseerd wanneer het humane eindpunt is bereikt.

Als een dier door omstandigheden (zoals het bereiken van humaan eindpunt van een kooigenoot) gedurende de studie individueel komt te zitten, wordt er geen nieuwe partner geïntroduceerd omdat dit meer stress oplevert dan individuele huisvesting voor de resterende tijd van een studie.

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.

Training: De dieren worden voor aanvang van de studie getraind om zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken, waardoor de stress kan worden verminderd.

Welzijn: Tijdens de studie zullen de dieren dagelijks worden geobserveerd door gekwalificeerde en competente dierverzorgers. Mochten er veranderingen optreden in gedrag, eetlust of ontlasting, dan zal de surveillance frequentie verhoogd worden en wordt de veterinaire hiervan op de hoogte gesteld waarmee

indien nodig een behandelplan zal worden opgesteld (zoals bv. aanbieden van andere voeding). Mocht het dier neurologische verschijnselen ontwikkelen of een afname van het gezichtsvermogen dan zal de observatie geïntensiveerd worden; mocht daar aanleiding toe zijn, dan zal het betreffende dier uit studie genomen worden.

Medicatie: Pijn en lijden kunnen worden waargenomen. In een dergelijk geval zal in overleg met de dierenartsen worden besloten of er adequate pijnbestrijding kan en moet worden voorgeschreven. De medicatie die kan worden toegediend is afhankelijk van het experiment. In de meeste gevallen mag de pijnmedicatie geen anti-ontstekingsmiddelen bevatten omdat deze mogelijk interfereren met de vraagstelling.

## 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.

Niet van toepassing

## 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.

In MS patiënten wordt soms pijnlijke spasticiteit waargenomen. Dit is tot nu toe niet gezien in EAE studies, maar kan niet voor de volle 100% worden uitgesloten. Wanneer symptomen van pijn worden geobserveerd zal orale of parenterale pijnstilling worden toegediend na overleg met de veterinaire. De medicatie die kan worden toegediend is afhankelijk van het experiment. In de meeste gevallen mag de pijnmedicatie geen ontstekingsremmende middelen bevatten

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. ongerief door toediening van een injectie/bijwerking adjuvant
2. ongerief door sedatie en ontwaken uit sedatie
3. ongerief door klinische symptomen EAE
4. evt. single huisvesting

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. De inspuiting van een kleine hoeveelheid inoculum voor immunisatie kan ontsteking en irritatie geven. Wij verwachten –gezien het uitgebreide voorwerk dat is verricht met Mimyc- dat er zich geen granuloma's zullen vormen. Wij kunnen dit echter niet helemaal uitsluiten. Immunisatie met MiMyc is getest in combinatie met virale antigenen, en nog nooit met auto-antigenen zoals MOG.
2. Bijkomen uit een sedatie kan een gevoel van desoriëntatie en/of misselijkheid met zich meebrengen.
3. EAE leidt tot symptomen als ataxie, blindheid, paresis en paralyse. Het verlies van neurologische functies kan als stressvol worden ervaren.
4. Dieren worden normaliter in duo's gehuisvest omdat het sociale dieren zijn. Alleen gehuisvest zitten kan stress geven. Wanneer een kooimaatje vanwege de ernst van de EAE uit de studie dient te worden genomen, is single huisvesting echter onontkoombaar.

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

1. Alle dieren worden getraind om te wennen aan de experimentele procedures. Ongerief van inspuitingsplaatsen zal naar verwachting licht zijn. Wanneer nodig zal in overleg met de dierenarts medicatie worden toegepast.
2. Voor sedatie moet het dier nuchter blijven. Daarnaast worden alle dieren extra in de gaten gehouden na het ontwaken en wanneer nodig zal de veterinar worden geraadpleegd.
3. We werken met een cumulatieve discomfort schaal (zie paragraaf J). Dieren worden geëuthanaseerd wanneer het humane eindpunt is bereikt.
4. Als een dier door omstandigheden (zoals het bereiken van het humane eindpunt van een kooigenoot) gedurende de studie individueel komt te zitten, wordt er geen nieuwe partner geïntroduceerd omdat dit meer stress oplevert dan individuele huisvesting voor de resterende tijd van een studie.

### **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.

Dieren worden geëuthanaseerd, gevolgd door uitgebreide sectie, wanneer het eindpunt volgens de tabellen is bereikt, of als het maximaal aantal vooraf geplande dagen is bereikt, of wanneer het algemeen welzijn door andere omstandigheden ernstig wordt aangetast. De maximale duratie in de tabellen is cumulatief. De humane eindpunten voorkomen dat matig ongerief ernstig wordt en daarom is er geen sprake van ernstig ongerief in deze dierproef. Door hanteren van deze eindpunten worden de dieren uit studie genomen in een fase waarin de dieren nog steeds zelfredzaam zijn en waarin zelfstandig eten en drinken en het aangaan van sociale interacties in voldoende mate mogelijk blijven.



EAE score	Klinische symptomen	Maximale cumulatieve tijdsduur
0	Asymptomatisch	Einde experiment
0.5	Verminderd alert, veranderd loopgedrag zonder ataxie, Verminderde eetlust, braken	Einde experiment
1	Apathisch (verminderde reactie op externe prikkel)	Einde experiment
2	Ataxie (= evenwichtsstoornis), afname gezichtsvermogen	Maximaal 3 dagen
2.5	Parese (incomplete verlamming) van 1 of meer ledematen	24 uur
3.0	Paralyse (complete verlamming) van 1 (hemiplegie) of meerdere ledematen (paraplegie)	24 uur
4.0	Complete verlamming van 4 ledematen (quadriplegie)	<12 uur
5.0	Lethargie (geen reactie op externe prikkel) Niet zelfstandig kunnen eten en drinken, Meer dan 2 dagen blind, Onbehandelbare pijn	<2 uur

**Tabel 4: Cumulatieve EAE scoringstabel voor resus makaken**

Dieren worden dagelijks gemonitord voor symptomen. Vanaf score 1 wordt dit meerdere keren per dag gedaan. Wanneer een score bereikt wordt hoger dan score 2, dan zal euthanasie zo snel mogelijk plaats vinden, het is daarmee onwaarschijnlijk -maar niet volledig uit te sluiten- dat scores boven de 2.5 uit zouden komen.

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

Tussen de 80 en 100%.

#### 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.

Het cumulatieve ongerief wordt geclassificeerd als 'matig'. Het ongerief wordt bepaald door herhaalde bloedafnames, herhaalde injecties en het ontwikkelen van EAE symptomen, waarbij een maximale EAE score van 2 gehanteerd wordt. Scores hierboven (zoals die mogelijk zelfs alleen maar op zouden kunnen treden door een onverwachts snelle ziekteprogressie en die daarmee direct tot euthanasie zouden leiden), of een tijdsduur langer dan 3 dagen met een score van 2, zullen leiden tot een humaan eindpunt. De kans op ontwikkeling van verlammingssymptomen is hiermee zeer klein. Indien er geen EAE symptomen optreden, bijvoorbeeld omdat de nieuwe inductie-methode niet het gewenste resultaat oplevert, blijft het ongerief matig als gevolg van de herhaalde bloedafnames en injecties.

### 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.

De dieren worden altijd gedood aan het einde van het experiment. Ten einde onderzoek te kunnen doen naar de pathologie in het CZS en de immuunresponsen in de lymfoïde organen is het noodzakelijk de dieren te euthanaseren. Ook wanneer de dieren geen neurologische verschijnselen ontwikkeld hebben, is het mogelijk dat er subklinisch wel neuroinflammatie aantoonbaar is. Deze informatie is erg belangrijk en alleen te verkrijgen na necropsie en neuropathologische analyse.

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

