



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 |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="1"/> | <input type="text" value="Malaria infectie van resusapen"/> |

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.

Omdat *P. cynomolgi* parasieten niet zodanig *in vitro* gekweekt kunnen worden dat voldoende sporozoieten geproduceerd kunnen worden, moet voor iedere stap in het geneesmiddelen ontwikkelingsproces waarbij sporozoieten nodig zijn een resusaap geïnfecteerd worden om aan de benodigde parasieten te komen. In de praktijk worden 2 ontwikkelingsstadia van de parasiet gebruikt voor onderzoek: Dit zijn a) **sporozoieten** die worden verkregen uit muggen die hebben gevoed op met malaria geïnfecteerd apenbloed en b) **bloedstadiumparasieten** die direct uit de geïnfecteerde aap worden verkregen.

a) Sporozoiet productie. Sporozoieten worden gebruikt in een aantal verschillende experimenten, te weten:

1. Het *in vitro* screenen van grote hoeveelheden chemische/biologische stoffen om activiteit op slapende leverstadium parasieten (hypnozoieten) te onderzoeken.
2. Het *in vitro* bestuderen van de biologie van leverstadium parasieten en het zuiveren van grote hoeveelheden leverstadium parasieten voor zgn. -omics studies.
3. Het homogeen infecteren van groepen apen met sporozoieten in een geneesmiddelen effectiviteitsstudie (zie bijlage 2/3).
4. Het maken van bloedstadium parasiet stocks. Malaria parasieten die langdurig als bloedstadium worden doorgezet verliezen het vermogen om muggen te infecteren en sporozoieten te maken. Dat wordt voorkomen door verse stocks te gebruiken die gemaakt zijn uit een infectie met sporozoieten.

b) Bloedstadiumparasiet productie. Bloedstadiumparasieten worden gebruikt voor:

1. Het infecteren van muggen met malaria om sporozoieten te genereren
2. Het maken van parasiet stocks (na infectie als onder a-4) voor later gebruik
3. Het opzuiveren van bloedstadiumparasieten voor genetische modificatie studies (transfectie). Na transfectie worden dan uiteindelijk sporozoieten geproduceerd voor verder leverstadium onderzoek.

In alle gevallen wordt als volgt te werk gegaan. Na i.v. injectie (onder sedatie) van bloedstadium parasieten (uit een ingevroren stock of vers afkomstig van een andere geïnfecteerde aap) of van sporozoieten (optie a-4), wordt de ontwikkeling van bloedparasitemie gevolgd door regelmatig bloedsmeertjes te maken van een druppel bloed, verkregen vanuit een prikje met een naald in het bovenbeen. Bij voldoende hoge parasitemie (>0,2% van de rode bloedcellen is geïnfecteerd; in uitzonderlijke gevallen, als blijkt dat de parasitemie niet verder oploopt, kan ook bij een lagere parasitemie gebloed worden) in de juiste ontwikkelingsstadia (primaire uitkomst parameter) wordt bloed afgenomen om *ex vivo* malaria muggen te voeden voor sporozoiet productie of voor het opwerken van bloedstadium parasieten (alle grotere bloedafnames worden gedaan onder sedatie). Bij transfectie studies (optie b-3) wordt geïnfecteerd bloed afgenomen om de bloedstadium parasieten op te zuiveren om ze daarna te transfecteren. De transfectie constructen bevatten een resistentie merker tegen een chemische stof. De getransfecteerde parasieten worden vervolgens in een ontvanger aap gespoten. De dieren krijgen de chemische stof toegediend om de getransfecteerde parasieten te selecteren; alleen succesvol getransfecteerde parasieten kunnen die behandeling overleven. Als de parasitemie na behandeling hoog genoeg is (zelfde criteria als hierboven genoemd) wordt bloed afgenomen om muggen te voeden voor leverstadium onderzoek en/of stocks te maken. Wanneer de parasitemie laag blijft en geen muggen gevoed kunnen worden, wordt bloed afgenomen om een tweede ontvanger aap te infecteren, waarin de parasieten meestal beter uitgroeien, zodat muggenvoedingen kunnen worden uitgevoerd. Bij alle hiervoor beschreven bloedstadium infecties worden de apen aan het eind van het experiment genezen van malaria.

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 naaldprik in het been. Dieren worden getraind om mee te werken aan deze procedure d.m.v. positive reinforcement training, en beloond met iets lekkers (5-15x per dier; 5 min). Grotere bloedafnames gebeuren onder sedatie (max 4 x i.m. injectie; 10 min). Genezing van bloedstadium malaria gebeurt door i.m. injecties met anti-malaria middelen (3 x i.m. injectie; 2 min). Als een aap met sporozoieten geïnfecteerd is, wordt de aap radicaal genezen d.m.v. de huidige standaard behandeling om bloedstadia (5 x i.m. injecties; 2 min.) en leverstadia (orale toediening door drinken uit spuit; 3-7 keer; 2 min.) te doden. Bij gebruik van transgene parasieten krijgen de dieren om de dag pyrimethamine verstoep in een stukje fruit, om eventueel aanwezige wild type parasieten te doden (3-4x oraal; 2 min). De duur van een infectie is ongeveer 2 weken, totdat de parasitemie hoog genoeg is om geïnfecteerd bloed af te nemen. Bij infectie met getransfecteerde parasieten kan dit oplopen tot 4-5 weken.

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 per jaar naar verwachting uitgevoerd wordt waarvoor bloedstadia of sporozoieten nodig zijn. Het aantal apen zal tot het minimum beperkt worden dat nodig is om de proeven uit te voeren. De belangrijkste parameter is daarbij de hoeveelheid levensvatbare parasieten die afgenomen kunnen worden per dier. Er worden in deze bijlage geen groepen dieren met elkaar vergeleken en een power analyse is hier niet van toepassing.

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
1	Macaca mulatta	"purpose bred"	>4 jaar	128	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, zowel met sporozoieten als met bloedstadia, zorgvuldig gekarakteriseerd. Hierdoor kunnen we met minimale aantallen controles van de bloedparasitemie toe om de parasitemie te volgen tot het tijdstip van parasieten isoleren of de dieren te genezen. Parasitemie wordt gecontroleerd dmv het afnemen van een druppel bloed uit een naald prikje in het been. Sinds kort kunnen <i>P. cynomolgi</i> bloedstadia <i>in vitro</i> gekweekt worden, maar het voeden van muggen op deze kweken leidt nog niet tot voldoende sporozoieten voor leverstadium onderzoek. Bijvoorbeeld transfectietechnieken en -constructen kunnen dus wel <i>in vitro</i> geoptimaliseerd worden, maar om sporozoieten voor leverstadium onderzoek te produceren is vooralsnog een <i>in vivo</i> transfectie nodig met de geoptimaliseerde technieken.
Herkomst	De resusapen van Indiase afkomst komen uit onze eigen fokkolonie en zijn uitstekend te infecteren met <i>P. cynomolgi</i> sporozoieten en bloedstadia, met reproduceerbare infectie patronen.
Levensstadia	<i>P. cynomolgi</i> infecteert jonge en oude dieren even goed.
Aantal	<ul style="list-style-type: none"> a) Voor leverstadium drug assays: Met <u>50 dieren</u> kunnen maximaal 50 series drug assays in 5 jaar uitgevoerd worden (naar schatting 10 <i>in vitro</i> tests per jaar). Hiermee kunnen we naar schatting 200.000 stoffen in 'medium throughput' screenen. b) Voor <i>in vivo</i> transfecties is 1 parasiet donor aap nodig om voldoende bloedstadia te zuiveren voor transfectie. Met die parasieten kunnen ca. 3 verschillende transfecties uitgevoerd worden, waarvoor 3 ontvanger apen nodig zijn om de transfectanten te kunnen selecteren. We rekenen met nog 2 extra secundaire ontvanger apen, om bijv. parasieten die niet optimaal groeien verder te kunnen propageren in deze ontvangers om vervolgens muggen te kunnen voeden met bloed waarin zich voldoende parasieten bevinden voor transmissie. Met naar schatting 10 transfectie rondes in 5 jaar tijd (totaal <u>60 resusapen</u>) is er voldoende tijd om alle transfecties uitvoerig te karakteriseren en de resultaten mee te nemen in de volgende ronde. c) Verder hebben we ca. <u>6 apen</u> per jaar nodig voor propagatie van succesvolle transfectanten en/of wildtype parasieten voor verdere leverstadium studies, of om bijv. voldoende bloedstadium parasiet stocks te maken voor verder gebruik. d) We verwachten maximaal 2 <i>in vivo</i> drug efficacy studies uit te voeren in 5 jaar. Om deze dieren met sporozoieten te kunnen infecteren (bijlage 2), hebben we <u>2 parasiet donorapen</u> nodig. e) Voor PET-CT studies (bijlage 3) moeten parasiet donorapen geïnfecteerd worden met specifieke merkerparasieten, gemaakt onder onderdeel b, om sporozoieten te produceren die in bijlage 3 gebruikt worden. We verwachten <u>10 parasiet donorapen</u> nodig te hebben in 5 jaar tijd.

Geslacht	Er is geen verschil tussen mannen en vrouwen wat betreft P. cynomolgi 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 ziekteverschijnselen bij (hogere) bloedstadium parasitemie en chloroquine behandeling van bloedstadiumparasieten
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 en bij grotere bloedafnames. Soms zijn dieren misselijk na het bijkomen uit de verdoving
2. De malaria infectie zelf geeft (bij hogere parasitemieën) milde malaria verschijnselen, zoals een koortspiek, verminderde eetlust en verminderde activiteit wanneer de parasieten periodiek uit de geïnfecteerde rode bloedcellen barsten (iedere 48 uur). Lichte ziekteverschijnselen kunnen een bijwerking zijn van behandeling met anti-malaria medicijnen (zoals chloroquine).
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. Diervverzorgers controleren de dieren dagelijks, noteren de bevindingen op een speciaal observatieformulier voor malaria en waarschuwen de onderzoeker indien nodig. De parasitemie is zelfbeperkend, maar wordt goed in de gaten gehouden en de infectie wordt acuut genezen indien de boven beschreven ziekteverschijnselen verergeren en/of langer dan een halve dag aanhouden. Bijwerkingen van chloroquine gaan na enkele uren weer voorbij.
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 behandeld kan worden, geldt dit als humaan eindpunt.

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

<0.5%

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 voor parasiet donoren (ca 80% van de dieren); matig ongerief, indien veel beenprikjes gegeven moeten worden (ca. 20% van de dieren, vnl. in transfectiestudies), of als de malaria ziekteverschijnselen, als waargenomen en vastgelegd door bij de studie betrokken diervverzorgers, onverwacht hoog zijn.

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>Door het beperkte gastheer bereik van <i>P. cynomolgi</i> zijn alleen makaak soorten, met name resusapen (waar iets hogere bloedstadiumparasitemie te verkrijgen is, wat gunstig is voor infectie van muggen), te gebruiken voor dit type onderzoek. Er bestaan wel malaria soorten die knaagdieren infecteren, maar die vormen geen hypnozoieten. Hypnozoieten komen alleen voor bij malaria soorten die mensen en apen infecteren. Voor het screenen van geneesmiddelen is een <i>in vitro</i> platform ontwikkeld, maar om aan de benodigde parasieten te komen is steeds een parasiet donoraap nodig. <i>P. cynomolgi</i> bloedstadia kunnen sinds kort weliswaar <i>in vitro</i> gekweekt worden, maar het voeden van muggen op geïnfecteerde kweken leidt nog niet tot voldoende sporozoieten. Het gebruik van een <i>in vitro</i> test voor het screenen van chemische/biologische stoffen op activiteit tegen hypnozoieten vervangt het vroeger gebruikte <i>in vivo</i> model (<i>P. cynomolgi</i> in resusapen) voor screenen en dit heeft geleid tot een zeer grote reductie in het gebruik van proefdieren.</p> <p>De nieuwe <i>in vitro</i> bloedstadium kweek vervangt wel dierproeven om nieuwe transfectie technologieën te ontwikkelen en optimaliseren. Met meer optimale technieken zijn dan wellicht ook minder <i>in vivo</i> transfecties nodig om transgene parasiten te genereren te produceren voor leverstadium onderzoek, omdat het succespercentage van de transfecties groter is geworden.</p>
Vermindering	<p>De parasiet donorapen worden zeer efficiënt gebruikt; er wordt een maximale hoeveelheid muggen gevoed die we in 1 experiment kunnen hanteren (1000-1500). Waar mogelijk, worden donorapen van verschillende experimenten gecombineerd, bijvoorbeeld de donoraap voor de productie van sporozoieten voor <i>in vitro</i> drug screening en een <i>in vivo</i> effectiviteit studie. Van de transfectie donorapen wordt een maximale hoeveelheid bloed afgenomen (0,7% van het lichaamsgewicht per bloeding en niet meer dan 1% van het lichaamsgewicht binnen een periode van 4 weken) bij de maximale parasitemie in de donor aap (tussen de 0,7% en 3%, afhankelijk van de aap). Hieruit worden de bloedstadiumparasieten gezuiverd, om maximaal 3 transfecties met het parasiet materiaal te doen ($5 \times 10^7 - 10^9$ parasieten per transfectie, afhankelijk van de transfectie methode die voor het specifieke experiment nodig is). Het efficiënte gebruik van donorapen vermindert het aantal benodigde donorapen voor transfectie studies. Indien de parasitemie het toelaat in de ontvanger apen na transfectie, zullen we ook muggen voeden op het bloed van de primaire ontvangers, om pilot studies op leverstadia van getransfecteerde parasieten uit te kunnen voeren. Dit kan alleen als de parasieten na transfectie voldoende uitgroeien in de primaire ontvanger apen. Als voor bepaalde transfectanten al voldoende informatie verkregen is zal een secundaire ontvanger niet gebruikt worden.</p>
Verfijning	<p>Het bloedstadium parasitemie verloop van <i>P. cynomolgi</i> in resusapen is redelijk voorspelbaar, zowel bij bloedstadium als bij sporozoiet infecties. Hierdoor kunnen we het aantal benodigde beenprikjes om de parasitemie te volgen tot een minimum beperken, in ieder geval voor de standaard parasiet infecties (met wildtype of een specifieke goed gekarakteriseerde transgene parasiet). Voor de getransfecteerde parasieten is dit minder voorspelbaar, maar daar plannen we beenprikjes op strategische momenten rond periodes waarop parasieten verwacht worden, om de dieren zo min mogelijk lastig te vallen en toch de parasitemie ontwikkeling zo goed mogelijk te kunnen volgen. Bovendien maken we gebruik van getrainde dieren ('positive reinforcement' training), die vrijwillig hun been aanbieden voor een prikje, waarna ze een beloning ontvangen. Dit vermindert de stress bij de dieren. De muggenvoedingen gebeuren <i>ex vivo</i>, zodat de dieren geen last hebben van (veel) muggenbeten. Na infectie worden de dieren dagelijks gescoord op klinische symptomen m.b.v. een klinische scoringslijst.</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.

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.

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.

De dieren worden met standaard antimalariamiddelen behandeld (chloroquine of een ander standaard antimalariamiddel 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.

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

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.