



## 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 (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="2"/> | <input type="text" value="In vivo antimalaria drug studies in 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.

Wanneer uit de *in vitro* leverstadium drug screening nieuwe potentiële geneesmiddelen naar voren komen, moeten deze, na *in vitro* optimalisatie, *in vivo* getest worden om zeker te zijn dat ze *in vivo* werkzaam zijn tegen slapende leverstadium parasieten. Dit gebeurt in het gouden standaard model: met *P. cynomolgi* sporozoieten-geïnfecteerde resusapen. Indien succesvol kunnen de middelen verder ontwikkeld worden voor testen in patiënten, die met *P. vivax* geïnfecteerd zijn. In de *in vivo* effectiviteitsstudie zullen 3 groepen dieren geïnfecteerd worden met *P. cynomolgi* sporozoieten, zoals beschreven in bijlage 1. Na infectie worden alle dieren rond dag 10 bloedstadium positief; dit wordt gemonitord door regelmatig bloedsmeertjes te maken van een druppel bloed verkregen vanuit een prikje met een naald in het been, en deze te controleren op bloedstadium parasieten. Wanneer alle dieren positief zijn, worden bij een controle groep de bloedstadium parasieten gedood met een standaard bloedstadium malaria middel dat niet de slapende leverstadium parasieten doodt. In deze groep wordt de re-activatie van hypnozoieten gemonitord (zie hieronder). Eén of meerdere andere groepen worden, naast behandeling met standaard antimalariamiddelen om de bloedstadiumparasieten te doden, ook behandeld met verschillende (dagelijkse) doses van het experimentele middel tegen hypnozoieten. Het aantal groepen verschilt per experiment. Veelal zal deze behandeling gebeuren d.m.v. orale toediening via een sonde onder verdoving. Tijdens de dosering kan in sommige gevallen op enkele tijdstippen bloed afgenomen worden om de exacte concentratie van het nieuwe geneesmiddel in het bloed te bepalen. Een dag na het einde van de behandeling wordt gekeken of alle bloedstadium parasieten inderdaad verdwenen zijn, en daarna worden de dieren regelmatig d.m.v. prikjes in het been gemonitord op de terugkeer van bloedstadium parasieten (relapse), doordat (overlevende) hypnozoieten geactiveerd zijn. Tijd tot relapse is de primaire uitkomst parameter. Als de experimenteel behandelde dieren 100 dagen na behandeling nog parasiet-vrij zijn, worden ze beschouwd als volledig genezen. Een lange vertraging in de tijd tot relapse is een aanwijzing voor activiteit van het experimentele middel, maar kennelijk niet afdoende om de dieren volledig te genezen bij de gegeven dosering. In zulke gevallen kan ook de tijd tot de tweede relapse gemeten worden, die in de controle groep ca. 3 weken na de eerste relapse optreedt. De eerste relapse wordt dan weer behandeld met een bloedstadium malaria middel als boven beschreven. Aan het eind van het experiment worden alle dieren die een relapse gehad hebben radicaal genezen d.m.v. de huidige standaard behandeling om bloedstadia (dmv i.m. injecties) en leverstadia (via orale toediening) te doden. De dieren blijven leven na beëindiging van het experiment.

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 onder sedatie d.m.v. i.v. injectie (1x per dier; 10 min.). Veelal zal het te testen middel oraal toegediend worden (via gavage onder sedatie), ca. 1 x per dag gedurende 1-5 achtereenvolgende dagen. Bij herhaaldelijke toedieningen waarbij de dieren gesedeerd worden, zal ook 1x per dag extra voedsel worden toegediend via gavage, na toediening van het te testen middel. Kleine bloedafnames gebeuren door een naald prik in het been (ca. 45x in 120 dagen tijd; 5 min). Dieren worden getraind om deze procedure te ondergaan d.m.v. positive reinforcement training, en beloond met iets lekkers. Bloedingen voor concentratie metingen van geneesmiddelen gebeuren onder ketamine sedatie (i.m. injectie; max 5x verspreid over doseringsdagen; 10 min). Genezing van bloedstadium malaria gebeurt door behandeling via i.m. injecties met een standaard anti-malaria middel (3 x i.m. injectie; 2 min), waarna gewacht wordt tot een relapse (max 3x per experiment). Radicale genezing aan het eind van het experiment gebeurt door i.m. injecties met een anti-malaria middel dat bloedstadia doodt (5 x i.m. injecties; 2 min.) en een ander middel (oraal gedoseerd, na training van de dieren om uit een spuit te drinken; 3-7x; 2 min) om alle hypnozoieten te doden. Het totale infectie en behandelingsexperiment duurt maximaal 120 dagen.

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

Er worden power calculaties gebruikt om het aantal dieren te berekenen. Deze powercalculaties zijn gebaseerd op infectie data verkregen uit voorgaande experimenten, waaruit de tijd tot relapse (zowel eerste als tweede relapse) als functie van de hoeveelheid ingespoten sporozoieten bekend is. De berekening gebeurt met een 2x2 contingency tabel, met relapse data van 15 controle dieren. Hieruit volgt dat met 4 dieren per groep met een power van 80% een delay van 7 dagen tot relapse gemeten kan worden.

## 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
2	Macaca Mulatta	"purpose bred"	>4 jaar	24	M/V	nvt	nvt

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Resusapen zijn een natuurlijke gastheer van <i>Plasmodium cynomolgi</i> malaria parasieten en dit model is de gouden standaard voor het evalueren van de effectiviteit van anti-relapse middelen. Wij hebben de infectie met sporozoieten en de daaruit volgende relapsende bloedstadium malaria parasitemie zorgvuldig gekarakteriseerd. Hierdoor kunnen we met minimale aantallen controles van de bloedparasitemie toe om de parasitemie te volgen tot het tijdstip om de dieren te genezen. Parasitemie wordt gecontroleerd dmv het afnemen van een druppel bloed uit een naald prikje in het been.
Herkomst	De resusapen van Indiase afkomst komen uit onze eigen fokkolonie en zijn uitstekend te infecteren met <i>P. cynomolgi</i> sporozoieten, met reproduceerbare infectie patronen.
Levensstadia	<i>P. cynomolgi</i> infecteert jonge en oude dieren even goed.
Aantal	12 dieren (3 groepen van 4 dieren) in 1 effectiviteitsstudie geeft de mogelijkheid om 1 nieuw middel in twee verschillende dosis schema's, of 2 nieuwe middelen in één dosering te evalueren. Wij verwachten in 5 jaar niet meer dan 2 effectiviteitsstudies uit te voeren.
Geslacht	Er is geen verschil tussen mannen en vrouwen wat betreft <i>P. cynomolgi</i> infectie of parasitemie verloop
Genetisch gewijzigd	-
Stam	-

### C. Huisvesting en verzorging

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

Ja

Nee > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

### D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Ongerief door bijkomen uit de verdoving
2. Ongerief door ziekteverschijnselen bij (hogere) bloedstadium parasitemie en chloroquine behandeling van bloedstadium parasieten
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, tijdens drug doseringen/voeding per gavage en bij grotere bloedafnames. Soms zijn dieren misselijk na het bijkomen uit de verdoving
2. De malaria infectie zelf geeft (bij hogere parasitemieën) lichte malaria verschijnselen, zoals een koortspiek, verminderde eetlust en verminderde activiteit wanneer de parasieten periodiek uit de geïnfecteerde rode bloedcellen barsten (iedere 48 uur). Milde ziekteverschijnselen kunnen een bijwerking zijn van chloroquine- of andere antimalaria middelen behandeling
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. Dierverzorgers controleren de dieren dagelijks, noteren de bevindingen op een speciaal observatieformulier voor malaria en waarschuwen de onderzoeker indien nodig. De parasitemie is zelf-beperkend, maar wordt goed in de gaten gehouden en de infectie wordt acuut genezen indien de boven beschreven ziekte verschijnselen 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 op tijd 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.

Matig ongerief, door herhaaldelijk (dagelijks) verdoven tijdens de doseringen en door vele been prikjes die genomen worden in de loop van de studie. Dit geldt voor alle dieren in de studie.

## G. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging	Door het beperkte gastheer bereik van <i>P. cynomolgi</i> zijn alleen makaka soorten, met name resusapen, te gebruiken voor dit type onderzoek. Er bestaan wel malaria soorten die knaagdieren infecteren, maar die vormen geen hypnozoieten. Deze komen alleen voor bij malaria soorten die mensen en apen infecteren. Voor het op grote schaal testen van vele stoffen hebben we een <i>in vitro</i> platform ontwikkeld; stoffen die hieruit naar voren komen en geoptimaliseerd zijn moeten eerst in het diermodel getest worden op <i>in vivo</i> activiteit, voordat met klinische trials kan worden begonnen.
Vermindering	Met een powercalculatie zoals hierboven beschreven is het minimale aantal dieren per groep bepaald dat nodig is om tot significante uitkomsten te komen.
Verfijning	We maken gebruik van getrainde dieren die vrijwillig hun been aanbieden voor een prikje met een naald om een druppel bloed af te nemen of voor een geneesmiddel/verdovingsinjectie (positive reinforcement training). Daarna krijgen ze een beloning. Deze procedure vermindert de stress bij de dieren voor dit soort procedures. Er wordt cameratoezicht gebruikt tijdens de geneesmiddelen toediening om eventuele onverwachte bijwerkingen bij de dieren snel waar te kunnen nemen en in te kunnen grijpen. Omdat we in grote lijnen weten wanneer we parasieten in het bloed kunnen verwachten, kunnen we de timing van de prikjes daarop afstemmen, waardoor in totaal minder prikjes nodig zijn, terwijl we toch de parasitemie ontwikkeling goed vast kunnen leggen. Voor de orale toediening van primaquine/tafenoquine om hypnozoieten te doden worden de dieren getraind voor het vrijwillig drinken uit een spuit. Om de bittere smaak van primaquine enigszins te maskeren, wordt een zoete siroop gebruikt. Als we een PET-CT methode hebben ontwikkeld om parasieten in de lever te kunnen volgen (bijlage 3), kunnen we de activiteit van nieuwe geneesmiddelen op leverstadia mogelijk direct waarnemen, dit zou de duur van het experiment aanzienlijk bekorten en leiden tot minder invasieve handelingen.

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 en experimenten met deze parasiet gebeuren onder inperkingsniveau 2 (DMII en MLII).

## 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<sup>e</sup> 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 antimalaria middelen behandeld (chloroquine of andere standaard antimalariamiddelen voor bloedstadia en primaquine of tafenoquine voor hypnozoiten) 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.