

Inventaris Wob-verzoek W16-01									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015241								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x		x	x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x		x	x	
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Acceptatiebrief				x		x	x	
10	Advies CCD		x						x
11	Beschikking en vergunning				x		x	x	
12	Mail beschikking en vergunning 15-10-2015				x		x	x	

15 SEP. 2015



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>4 1 0 5 5 6 2 9</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9									
Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Geert Grooteplein 10</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>9101</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6500HB Nijmegen</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL90ABNA0231209983</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>UMC St Radboud</td></tr></table>	Straat en huisnummer	Geert Grooteplein 10	Postbus	9101	Postcode en plaats	6500HB Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud					
Straat en huisnummer	Geert Grooteplein 10																
Postbus	9101																
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen																
IBAN	NL90ABNA0231209983																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>researcher</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	researcher		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	researcher																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters Dhr. Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 0 . 1 0 . 2 0 1 5
- Einddatum 1 0 . 0 4 . 2 0 1 9
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- prevention of infection around skin penetrating limb prostheses
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- voorkomen van wondinfecties rond prothesen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- DEC-advies, factuurinformatie

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Nijmegen

Datum 10 - 10 - 2015

Handtekening [REDACTED]



**Form
Project proposal**

- This form should be used to write the project proposal of animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed
- For more information on the project proposal, see our website(www.zbo-ccd.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3 Provide the title of the project.	Prevention of infection around skin penetrating limb prostheses

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.	<input checked="" type="checkbox"/> Basic Research <input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research <input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production <input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier <input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures <input type="checkbox"/> Higher education or training
---	---

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Due to a congenital defect or a surgical amputation patients may be treated with an external prosthesis to regain functionality of the missing part of their body. Conventionally, an external prosthesis has a socket, which matches the shape of the residual stump and is attached to it by belts and cuffs, and/or by means of suction. Over the years, this kind of prostheses has improved the lives of amputees due to the technological advancements, allowing them to be more mobile and to better engage in an active lifestyle. However, socket prostheses are not without limitations, such as overload and irritation of the adjacent soft tissues, disuse osteoporosis in the residual limb, difficulty in ongoing socket fit due to weight fluctuations and muscular atrophy, and difficulty in fitting individuals with short residual limbs.¹

To overcome these limitations, an alternative for the stump-socket attachment is the bone-anchored percutaneous prosthesis, also known as the endo-exo prosthesis.² The technology is characterized by the fixation of the endo-device in the medullary canal of the femoral bone and the creation of a percutaneous exit-site for the attachment of the exo-limb prosthesis. The treatment of the bone-anchored prosthesis has significant advantages over the conventional design; it avoids stump irritation, and directly transfers loads from the external prosthesis to the human body, which leads to a significant improvement of the function of patients. The technique is rather successful, but during the recent years an increasing number of so-called "peri-implant" infections is observed.^{5,6} The treatment of the bone-anchored prosthesis has significant advantages over the conventional design; it avoids stump irritation, and directly transfers loads from the external prosthesis to the human body, which leads to a significant improvement of the function of patients. A comparative study of patients with trans-femoral amputation reported that 37% of patients with a socket prosthesis had restricted hip flexion compared with 0% patients with a bone-anchored prosthesis.⁷ In another study of 32 patients with upper or lower limb amputation, patients who had bone-anchored prostheses demonstrated significantly lower thresholds for detection of vibratory stimulation of the prosthetic limb compared with patients who had socket prostheses, indicating that the proprioceptive capacity of bone-anchored prostheses is larger than that of conventional socket ones.⁸ However, the drawback of percutaneous implants is the relatively high incidence of infections at the percutaneous passage, due to the damaged integrity of the skin, which otherwise forms a natural defense system against the ingress of bacteria and debris. The infection rate of the endo-exo prostheses is still very high based on the literature, e.g. reported to be between 13%–30%.⁹⁻¹² Although infection does not always lead to implant loosening, revision and/ or even removal of the implant, it still is a major cause of pain, medication, and prolonged hospital time for the involved patients. Although Aschoff and Juhnke¹³ reported that the prevalence of infections can be reduced by adjusting the shape of the prosthesis in 2012, exit-site infections remain one of the main complications for percutaneous devices¹⁴. The approach

we adopt in this study, i.e. using antibacterial patches and sleeves, will also be potentially applicable for the other types of percutaneous devices, such as permanent catheters, orthopaedic fixation devices, or drivelines for ventricular assist devices, etc.

The traditional strategy to combat such infections is the use of systemic antibiotic prophylaxis.^{15, 16} However, to achieve effective therapeutic drug concentrations in the infected area, there is a need of a high parenteral dose of antibiotics, which can cause systemic toxicity.¹⁷ Potential advantages of local delivery are obvious. Side-effects of systemic treatments are prevented and higher local more effective dosages are obtained near the infected site, thereby reducing the treatment duration.¹⁸ Currently, the major strategy for local drug delivery is a drug release system. ¹⁹ A drug release system is a device preferentially located at the peri-implant site with a sustained and high release of disinfectants, bacteriostatic drugs or antibiotics reaching effective concentrations.

Antimicrobial patches have already been applied earlier for the prevention of intravascular device-related bloodstream infection. ²⁴ However, the currently available patches are not ideal to be used around prostheses. For this research we want to exploit the electrospinning technique to produce materials that are very appropriate to use as a wound dressing material. Electrospun nanofibers for such application exhibit several useful properties, like a high oxygen permeability, high porosity, variable pore size distribution and a high surface-to-volume ratio that can promote haemostasis and absorb wound exudates. ²⁵ Furthermore, the morphology of electrospun nanofibres is similar to that of the natural extracellular matrix (ECM) in the skin and has been shown to promote cell adhesion, migration and proliferation.²⁵ The antibacterial patches will be electrospun with materials mixed with antibacterial drugs (). The patch that will be produced has a central fenestration and a side slit to facilitate easy application around percutaneous implants. It will be held in place with medical grade adhesive tape. For later use, patients can change the patches by themselves easily on a daily or weekly basis.

Similar to antibacterial patches, the sleeve will also deliver antibacterial agents to the percutaneous exit-site. The antibacterial sleeve will be placed over the implant at the time of surgery, and will be manually pushed through the subcutaneous tissue up to the area of the implant where tissue in-growth is expected. One of the advantages of the sleeve design is that it can be (re)placed after the implant has been inserted and thus does not interfere with prosthesis placement. The supposed efficacy of the sleeve approach is based on reports dealing with the use of antibacterial sleeves to prevent pin tract infection around external fixation pins as used for the stabilization of complicated bone fractures.^{26,27} Nevertheless, there are no commercially available antibacterial sleeves for percutaneous devices on the market yet. Moreover, the combination of patch and sleeves is not studied before, and this combination may produce better antibacterial effects.

Based on aforementioned, the aim of the project is to develop an effective strategy to prevent the occurrence of short as well as long term infections of percutaneous implants. The end goal is to provide a safe and cost-efficient treatment when using bone-anchored prostheses. As the presence of a permanent skin penetration provides a constant entrance for bacteria around percutaneous devices, the implants should be designed such that after wound healing a stable junction is created at the exit site of the bone-anchored limb prosthesis, which will then act as a barrier for bacterial ingress. In the current project, it is hypothesized that such a situation can be achieved by the application of an effective antimicrobial approach. Therefore, we intend to combine two approaches, i.e. an antimicrobial patch and sleeve, to guarantee long term efficacy for the bone-anchored implants.

References:

1. Isackson, D., L.D. McGill, and K.N. Bachus, Percutaneous implants with porous titanium dermal barriers: an in vivo evaluation of infection risk. *Med Eng Phys*, 2011. 33(4): p. 418-26.

2. Aschoff HH, Clausen A, and Hoffmeister T, The endo-exo femur prosthesis--a new concept of bone-guided, prosthetic rehabilitation following above-knee amputation. *Z Orthop Unfall* 147, 610, 2009.
3. Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, and Ohlsson A, Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 3, 81, 1969.
4. Branemark R, Branemark PI, Rydevik B, and Myers RR, Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: a review. *J Rehabil Res Dev* 38, 175, 2001.
5. Simonis P, Dufour T, and Tenenbaum H, Long-term implant survival and success: a 10-16-year follow-up of non-submerged dental implants. *Clin Oral Implants Res* 21, 772, 2010.
6. Badran K, Arya AK, Bunstone D, and Mackinnon N, Long-term complications of bone-anchored hearing aids: a 14-year experience. *J Laryngol Otol* 123, 170, 2009.
7. Hagberg K, Haggstrom E, Uden M, and Branemark R, Socket versus bone-anchored trans-femoral prostheses: hip range of motion and sitting comfort. *Prosthet Orthot Int* 29, 153, 2005.
8. Jacobs R, Branemark R, Olmarker K, Rydevik B, Van SD, and Branemark PI, Evaluation of the psychophysical detection threshold level for vibrotactile and pressure stimulation of prosthetic limbs using bone anchorage or soft tissue support. *Prosthet Orthot Int* 24, 133, 2000.
9. Aschoff, H.H., Juhnke, D.L., 10 Jahre endo-exo-femurprothetik zur rehabilitation nach Oberschenkelamputation—Daten, fakten und ergebnisse. *Z. Orthop. Unfallchir.* 150, 607–614,2012.
10. Aschoff, H.H., Kennon, R.E., Keggi, J.M., Rubin, L.E., Transcutaneous, distal femoral, intramedullary attachment for above-the-knee prostheses: an endo-exo device. *J. Bone Joint Surg. Am.* 92 (Suppl. 2), 180–186,2010.
11. Hagberg, K., Brånemark, R., One hundred patients treated with osseointegrated transfemoral amputation prostheses—rehabilitation perspective. *Rehabilitation* 46, 331–344,2009.
12. Tillander J, Hagberg K, Hagberg L, and Branemark R, Osseointegrated titanium implants for limb prostheses attachments: infectious complications. *Clin Orthop Relat Res* 468, 2781, 2010.
13. ASCHOFF, H. H.; JUHNKE, D. L. 10 Jahre Endo-Exo-Femurprothetik zur Rehabilitation nach Oberschenkelamputation–Daten, Fakten und Ergebnisse.*Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie*, 2012, 150.06: 607-614.
14. Johannes Großhauser, Katja Reiter, Christian Große-Siestrup, et al. Bionic approach for the prevention of exit-site infections of percutaneous devices. *Tech (Berl)*. 2015 Jun 1;60(3):225-33.
15. Norden CW, Antibiotic prophylaxis in orthopedic surgery. *Rev Infect Dis* 13 Suppl 10, S842-S846, 1991.
16. Nasser S, Prevention and treatment of sepsis in total hip replacement surgery. *Orthop Clin North Am* 23, 265, 1992.
17. El Helou OC, Berbari EF, Marculescu CE, El Atrouni WI, Razonable RR, Steckelberg JM, Hanssen AD, and Osmon DR, Outcome of enterococcal prosthetic joint infection: is combination systemic therapy superior to monotherapy? *Clin Infect Dis* 47, 903, 2008.
18. Campbell AA, Song L, Li XS, Nelson BJ, Bottoni C, Brooks DE, and DeJong ES, Development, characterization, and anti-microbial efficacy of hydroxyapatite-chlorhexidine coatings produced by surface-induced mineralization. *J Biomed Mater Res* 53, 400, 2000.
19. Fu, R., et al., A novel electrospun membrane based on moxifloxacin hydrochloride/poly(vinyl alcohol)/sodium alginate for antibacterial wound dressings in practical application. *Drug Deliv*, 2014: p. 1-12.
20. Li, M., B. Han, and W. Liu, Preparation and properties of a drug release membrane of mitomycin C with N-succinyl-hydroxyethyl chitosan. *J Mater Sci Mater Med*, 2011. 22(12): p. 2745-55.

- [REDACTED]
- [REDACTED]
24. Hanazaki K, Shingu K, Adachi W, Miyazaki T, and Amano J, Chlorhexidine dressing for reduction in microbial colonization of the skin with central venous catheters: a prospective randomized controlled trial. *J Hosp Infect* 42, 165, 1999.
25. Charernsriwilaiwat, N., et al., Electrospun chitosan/polyvinyl alcohol nanofibre mats for wound healing. *Int Wound J*, 2014. 11(2): p. 215-22.
26. Forster H, Marotta JS, Heseltine K, Milner R, and Jani S, Bactericidal activity of antimicrobial coated polyurethane sleeves for external fixation pins. *J Orthop Res* 22, 671, 2004.
27. Voos K, Rosenberg B, Fagrhi M, and Seligson D, Use of a tobramycin-impregnated polymethylmethacrylate pin sleeve for the prevention of pin-tract infection in goats. *J Orthop Trauma* 13, 98, 1999.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

From a functional point of view the percutaneous bone-anchored limb prosthesis has considerable advantages relative to the socket prosthesis, but the infection risk is relatively high and should be reduced to an acceptable level. The aim of the project is to develop an effective strategy to prevent the occurrence of short as well as long term infections of percutaneous implants. The end goal is to provide a safe and cost-efficient treatment when using bone-anchored prostheses.

The project relies on the cooperation of [REDACTED]

[REDACTED] Each group has an excellent (inter)national standing and ample contacts in their respective fields of work. The groups together comprise a considerable 'critical mass', illustrated by the presence of over 35 PhD students and post-docs.

The research program has an interdisciplinary character, using engineering approaches for medical purpose. It is based on cooperation in the fields of [REDACTED]. All experiments will be carried out within [REDACTED]. The project perfectly fits with ongoing research in these laboratories, which includes tissue engineering of bone, cartilage and meniscus, cell differentiation and culturing under dynamic culturing conditions, bioreactor technology and the development of advanced biomolecule delivery system by electrospinning and or other technologies. The combined laboratories possess all necessary equipment for this research, particularly three electrospinning apparatus to allow a large range of processing control. All animal studies will be performed in the [REDACTED], which is up-to-date facility, and equipped with relevant imaging facilities.

3.3 Relevance

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

It is expected that this research program will deliver relevant knowledge to prevent biomaterial-associated infection. All of those are among the strategic research under Roadmap Regenerative Medicine, Topsector Life Sciences Health. The project also fits the focus of Roadmap Pharmacotherapy, which includes a.o. "preventing hospitalization to contribute to cost efficiency of the healthcare system". The obtained knowledge of this project will be implemented in the design of an antibacterial product, which is beneficial for not only the bone-anchored limb prostheses, but also other types of bone-anchored percutaneous devices including bone-anchored hearing aids (BAHAs), pin tract devices for fracture healing and urine catheters.

3.4 Research Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

Antimicrobial patches and sleeves will be fabricated in this study. Antibacterial patches will be used as a potential wound dressing to prevent the infection around limb prosthesis. Antibacterial sleeves will be used as a second barrier to protect the skin-prosthesis interface. The key points of this project are proving efficacy (antibacterial property) and safety (biodegradability, biocompatibility, effect on wound healing) of the developed antibacterial materials in healthy conditions as well as in infected conditions. These materials are first tested *in vitro* to determine their mechanical and physiological properties, drug release kinetics, antibacterial properties, and cytocompatibility. The patches and the drugs concentration will have been optimized already *in vitro* before the start of the animal experiment.

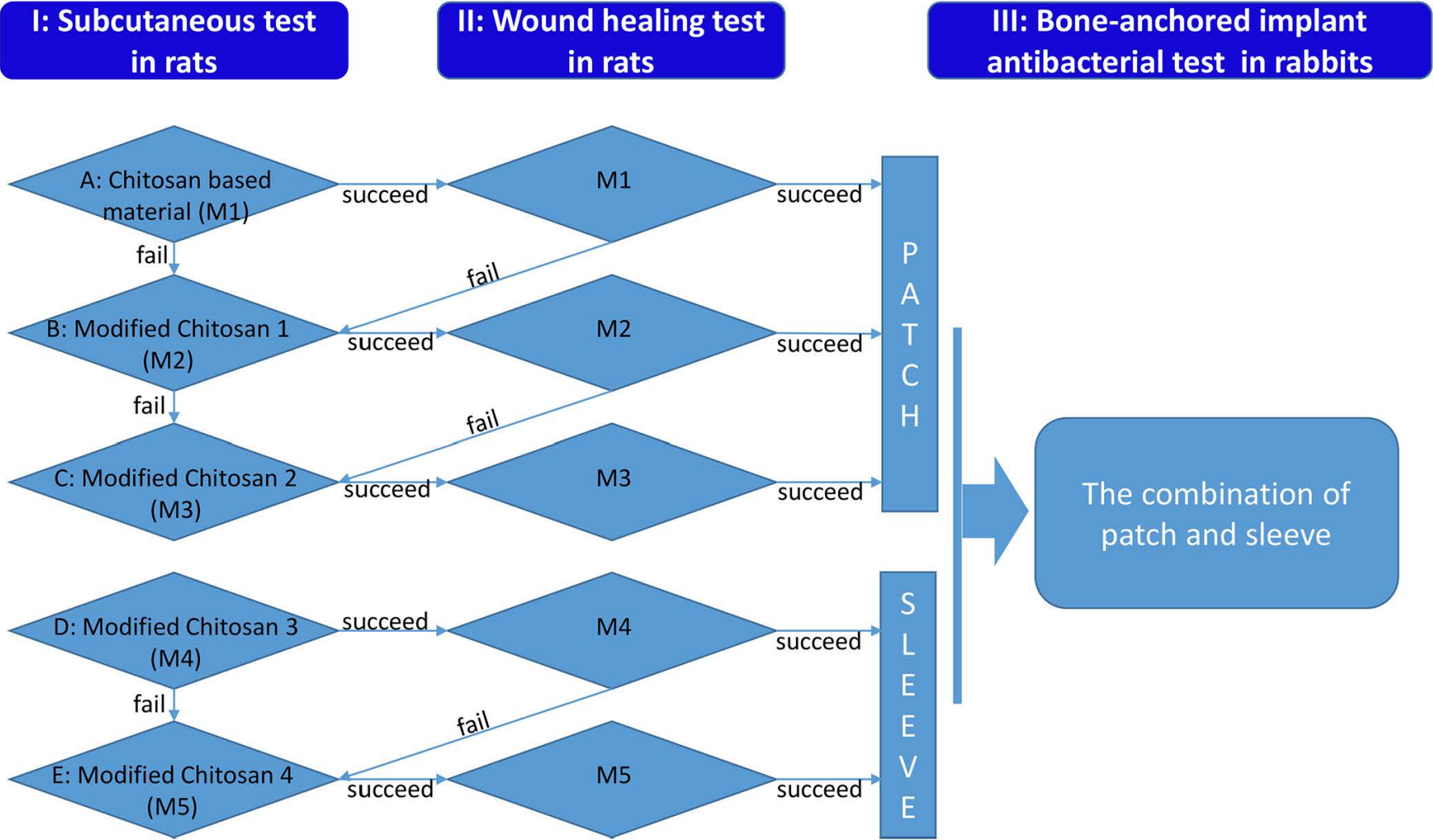
Based on the result of these *in vitro* studies, the materials with proper concentration of drugs will be further tested, to evaluate their *in vivo* antibacterial efficacy, and effect on wound healing.

The first step of the *in vivo* research strategy (after *in vitro* testing) is to evaluate the antibacterial property, biodegradability and biocompatibility of these materials in rats. When the material is proved to be biocompatible and effectively antibacterial, the wound healing test will be done to test effect on wound healing in rats. When both patch and sleeves are proved to reach our standard, they will be further tested in rabbits with bone-anchored implants to evaluate their long term antibacterial performance and tissue response. When in the 'lower animal species' one of the evaluated formulations does not live up to the requirements, this formulation in its current form will not be tested further until it is adjusted.

Three animal models will be used in this project based on the literature (shown in diagram):

1. Subcutaneous test in rats to test the antibacterial efficacy, biodegradability, and biocompatibility of materials [1, 2];
2. Wound healing test in rats to test its effect on wound healing process [3-6];

3. Bone-anchored implant antibacterial test in rabbits to evaluate tissue response and antibacterial efficacy in long term experiments [7, 8, 9].



The number of experiments is chosen based on the consideration that research may encompass with some risk of failure. We cannot try infinitely, but as a realistic number 5 is chosen as the limitation for this study. The experiment will be examined sequentially as shown in the diagram. The success criteria for test I is that the material shows antibacterial effect, acceptable biocompatibility and low biodegradability. The success criteria for test II is that the wound healing process is not inhibited compared to the sham group.

In test I, there are 4 groups, [REDACTED]. As a statistical replicate, we will take $n=6$. There are two defects per rat, one is used for biodegradability and biocompatibility assessment (without bacteria inoculation), the other for bacterial activity measurement (with bacteria inoculation). Therefore, the number of the animals maximally needed is 480 (5 studies \times 4 groups \times 6 samples \times 4 time points). In test II, [REDACTED]. Therefore, the number of the animals maximally needed is 120 (5 studies \times 4 groups \times 6 samples \times 4 time points / 4 wounds each rat). In test III, the group size ($n=18$) is based on literature. After the rat studies have given information about the spreading of the data on the antibacterial effect, we will recalculate whether this size can further be reduced. Here, the groups will be set as a combination of the successful patch and sleeve as follows: (1) no patch or sleeve (2) patch and sleeve (3) patch with drug (4) sleeve with drug, and (5) patch with drug and sleeve with drug. Therefore, the number of the animals maximally needed is 90 (1 study \times 5 groups \times 18 samples \times 1 time points).

Reference

1. Park, S.U., et al., The possibility of microbial cellulose for dressing and scaffold materials. *Int Wound J*, 2014. 11(1): p. 35-43.
2. Hart, E., et al., Efficacy of antimicrobial polymer coatings in an animal model of bacterial infection associated with foreign body implants. *J Antimicrob Chemother*, 2010.65(5): p. 974-80.
3. Xie, Z., et al., Dual growth factor releasing multi-functional nanofibers for wound healing. *Acta Biomater*, 2013. 9(12): p. 9351-9.
4. van Rossum, M., et al., The influence of a PHI-5-loaded silicone membrane, on cutaneous wound healing in vivo. *J Mater Sci Mater Med*, 2007. 18(7): p. 1449-56.
5. Jiang, B., et al., Investigation of lysine acrylate containing poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels as wound dressings in normal and infected wounds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2012. 100(3): p. 668-76.
6. Charernsriwilaiwat, N., et al., Electrospun chitosan/polyvinyl alcohol nanofibre mats for wound healing. *Int Wound J*, 2014. 11(2): p. 215-22.
7. Chou, T.G., et al., Evaluating antimicrobials and implant materials for infection prevention around transcutaneous osseointegrated implants in a rabbit model. *J Biomed Mater Res A*, 2010. 92(3): p. 942-52.
8. Williams, D., R. Bloebaum, and C.A. Petti, Characterization of *Staphylococcus aureus* strains in a rabbit model of osseointegrated pin infections. *J Biomed Mater Res A*, 2008.85(2): p. 366-70.
9. Qu, H., et al., Percutaneous external fixator pins with bactericidal micron-thin sol-gel films for the prevention of pin tract infection. *Biomaterials*, 2015. 62: p. 95-105.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

There are three animal models in this project with different study purposes: 1) a subcutaneous implantation model in rats to assess antibacterial efficacy, biodegradability, and biocompatibility; 2) a dermal wound healing test to evaluate the effect on wound healing in rats; 3) a bone-anchored percutaneous implant model in rabbits to test the long term antibacterial efficacy and tissue response.

First, the subcutaneous model in rats is a commonly used model to test the antibacterial properties of materials in vivo. Maximally five antibacterial materials will be examined in five studies as is shown in the diagram in 3.4.1. Two separate pockets will be created bilaterally to place the test

materials subcutaneously. As reported in literature (Tillander, J. 2010; Chou, T.G, 2010; Darouiche, R.O, 2007; Williams, D.2008), the most common bacteria in superficial and deep cultures are *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. Therefore, *S. aureus* is chosen in this experiment. 1×10^6 CFU of *S. aureus* will be inoculated randomly to one pocket to test the antibacterial efficacy, before suturing to close the wound (Emily Hart, 2010). After clinical signs of infection are evaluated and recorded, samples of the tissue around the incision, implanted materials and blood will be collected in preset time points (based on the in vitro drug release test result) to evaluate antibacterial efficacy, biodegradability, and biocompatibility by histological staining and microbiological methods. Bacteria and inflammatory cells in the tissue samples will be detected by Brown-Brenn modified Gram stain and hematoxylin and eosin (H&E). The Brown-Brenn stain was used to detect the presence of bacteria. The H&E stain is used for observing inflammation and fibrosis. The material sample in the infected pocket will be detected by microbiological method. Residual bacteria on the materials will be counted. The residual antibacterial property of the membranes will be tested to determine the efficient antibacterial duration by a Kirby-Bauer agar diffusion test, which is the most widely used antibacterial test. In Kirby-Bauer test, the materials will be placed on an agar plate inoculated with relevant bacteria. After 16 to 20 hours, there will be a transparent circle area around the material if the material has antibacterial effect. The size of the transparent area is correlated to the antibacterial efficacy. In this Kirby-Bauer test, we intend to evaluate whether the materials are still effective after predetermined time of in vivo experiment. This is important to know, as there is no antibacterial effect after the experiment, then this means that the patches should be replaced more frequently.

Second, the wound healing test is the most commonly used animal test for dermal wound studies. We foresee that maximally five antibacterial materials will be examined in this animal model as is shown in the diagram in 3.4.1. The wound area will be surgically created on the dorsum, and the potential test materials will be used to cover the wound area. The wound healing status will be detected at time points week 1, 2, 3, 4 using wound photography, histopathology and immunohistochemical methods.

Third, a rabbit model is used to further test the antibacterial efficacy and tissue response of combinations of sleeve and patch. This percutaneous animal model is commonly used to study the infection around implants. This animal model is used to detect the long term antibacterial efficacy and tissue response of the antibacterial patch and sleeve. The biocompatibility of the materials tested in rats is a representation of that in larger animals and humans. As we cannot use rats to perform the procedure described in the test III due to the size of implants, we have to choose larger animals, e.g. rabbits. Therefore, the implant will be planted on the rabbit tibia, and sleeves and/ or patches will be put around the implant to prevent infection. The patch and sleeve will be put individually or in combination. The sleeves and patches will be changed at certain time points based on clinical practice and the information of the rat test. 1×10^8 CFU of *S. aureus* will be inoculated at certain time point (e.g. from two weeks after operation and weekly after) until the end of the experiment (24 weeks). Clinical signs of infection, histological staining, and microbiology methods will be used to detect the long-term antibacterial property and tissue response of the materials by the technique shown in test I.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points

The aim of the project is to develop an effective strategy to prevent the occurrence of short as well as long term infections of percutaneous implants. The end goal is to provide a safe and cost-efficient treatment when using bone-anchored prostheses. This antibacterial materials should obey to clinical requirements, such as being safe for the patient, sustaining release of drugs and having excellent handling properties to fit the work of the surgeon. To reach the main goal of this project, different components should be considered and tested in a series of animal experiments. First of all, the developed antibacterial material should live up to its expectations, providing a slow drug release speed and good mechanical properties. Second, the developed antibacterial materials should be proven biocompatible, with good wound healing effect in rodents, the most common used and 'lowest' animal species possible for the research of a promising wound dressing. When one of the evaluated formulations does not live up to the requirements in rodents, this formulation in its current form will not be tested further in bigger animals until it is adjusted. When the material is

proven biocompatible, and shows normal wound healing, and is living up to its expectations (long antibacterial duration and good mechanical properties), further research can be done on the rabbit bone-anchored implant model to gain the ultimate proof of principle.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Subcutaneous test in rats
2	Wound healing test in rats
3	Bone-anchored implant antibacterial test in rabbits

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Subcutaneous test in rats

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

In this project, we will start to test chitosan based materials, for the reason that chitosan and its derivatives are known antimicrobial agents against fungi, bacteria and viruses. As chitosan alone may not fulfil the requirements to successfully be used as patches or sleeves, we will further modify this material to 1) improve the mechanical properties, and 2) achieve a sustained release of drugs.

In this test, two separate pockets will be created bilaterally to place the test materials subcutaneously. As is reported in literature (Tillander, J. 2010; Chou, T.G, 2010; Darouiche, R.O, 2007; Williams, D.2008), the most common bacteria in superficial and deep cultures are *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. Therefore, *S. aureus* is the only bacteria chosen in this experiment, because we prefer to work under carefully standardized tests and multi-bacterial compositions are hard to standardize. 1×10^6 CFU of *S. aureus* will be inoculated randomly to one pocket to test the antibacterial efficacy, before suturing to close the wound (Emily Hart, 2010).

After clinical signs of infection are evaluated and recorded, samples of the tissue around the incision, implanted materials and blood will be collected in preset time points (based on the in vitro drug release test result) to evaluate antibacterial efficacy, biodegradability, and biocompatibility by histological staining and microbiological methods. Bacteria and inflammatory cells in the tissue samples will be detected by Brown-Brenn modified Gram stain and hematoxylin and eosin (H&E). The Brown-Brenn stain was used to detect the presence of bacteria, and the H&E stain is used for observing inflammation and fibrosis. The material sample in the infected pocket will be detected by microbiological method. Residual bacteria on the materials will be counted. The residual antibacterial property of the membranes will be tested to determine the efficient antibacterial duration by a Kirby-Bauer agar diffusion test, which is the most widely used antibacterial test. In Kirby-Bauer test, the materials will be placed on an agar plate inoculated with relevant bacteria. After 16 to 20 hours, there will be a transparent circle area around the material if the material has antibacterial effect. The size of the transparent area is correlated to the antibacterial efficacy. In this Kirby-Bauer test, we intend to evaluate whether the materials are still effective after predetermined time of in vivo experiment. This is important to know, as there is no antibacterial effect after the experiment, then this means that the patches should be replaced more frequently.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Two separate pockets will be created bilaterally on the dorsum of the rats under [REDACTED] inhalation anesthesia to place the test materials subcutaneously. The implant area on the back is chosen to avoid as much as possible for the rats to bite or scratch the sutures and wound area. 1×10^6 CFU of *S. aureus* will be inoculated randomly to one pocket to test the antibacterial efficacy, before suturing to close the wound. During the surgery and post operation, the rats will receive analgesia (Rimadyl). The analgesia is used to give relieve to the rats. Although NSAIDs may have an influence on wound healing, this is the preferred method to closely mimic the clinical situation. After the procedure, the rats will be housed under standard conditions in groups. At the end of the experiment, rats will be euthanized at various time points (based on the in vitro study, 30 days in total). After clinical signs of infection are evaluated and recorded, samples of the tissue around the incision, implanted materials and blood

will be collected in preset time points (based on the in vitro drug release test result) to evaluate antibacterial efficacy (tissue sample from bacteria inoculation wound), biodegradability, and biocompatibility (sample from wound without bacteria inoculation) by histological staining and microbiological methods.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

Sample size will be calculated in line with the requirements of the [REDACTED] and based on the existing literature and the experience of our research group. Sample size is calculated in such a way that the study objectives can be achieved with the lowest number of animals possible. Calculation will be done with a power analysis. Bilateral skin defects will be created per animal (i.e. both side of dorsal skin) to reduce the total number of laboratory animals needed.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Five different antibacterial materials will be examined in five studies in this animal model as is shown in the diagram in 3.4.1. There are 4 groups, namely the [REDACTED]. As a statistical replicate, we will take n=6. There are two defects per rat, one is used for biodegradability and biocompatibility assessment (without bacteria inoculation), the other for bacterial activity measurement (with bacteria inoculation). The rats will be euthanized at various time points (based on the in vitro study, week 1, 2, 3, 4). Therefore, the number of the animals maximally needed is 480 (5 studies × 4 groups × 6 samples × 4 time points).

Skeletally mature, Wistar or Sprague Dawley rats of both sexes will be used in this project. Rats are "the lowest species" used to test the antibacterial efficacy, biodegradability, and biocompatibility of biomaterials in subcutaneous models. From a scientific point of view, this study will show the in vivo performance of the antibacterial membranes in terms of their antibacterial efficacy, biodegradability, and biocompatibility.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Wistar or Sprague Dawley Rats, both sexes	registered breeder	480	skeletally mature

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Refinement: This animal study will be performed with the lowest possible discomfort to the animals. Surgery will be performed under standard inhalation anesthesia according to the protocol approved by [REDACTED]. At the end of surgery and post operation, the animals will receive necessary painkillers. Housing and all living standards of the animals will be unaltered.

Replacement: The tissue response to the materials must be assessed in a living organism before they are used clinically. The in vitro liquid test environment is not a replacement to an in vivo environment, in which body fluids (containing many proteins/enzymes), and cellular systems by cell-mediated processes that can affect the release of antibacterial drugs and the degradation of the antibacterial material. Animal studies are required to investigate tissue biocompatibility, biodegradability and efficacy / duration of the antibacterial effect.

Reduction: A power analysis makes sure the number of animals will be the minimum to still have a reliable result. All developed antibacterial materials are tested to be sufficient in vitro on handling properties, i.e. mechanical properties, drug release characteristics, cytotoxicity before they are tested in vivo. Bilateral pockets will be created to reduce the total number of laboratory animals needed.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

The surgical procedures will be done under [REDACTED] and peri-operative pain control medication will be given to the animals. The surgical site is specifically chosen on the dorsolateral site to have the least amount of stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected. Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

Repetition and Duplication

E. Repetition

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

The [REDACTED] is used to mimic the clinical situation and give relieve to the rats although this may have an influence on wound healing. The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected. Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort (physiological changes: posture, gait, rapidity of breathing, increased heart rate; Behavioral changes: abnormal behavior such as jumping, freezing, squeaking, biting, escape behavior, pica-behavior, Hunched back, response to handling or other stimulus Response to hand clapping, aggressive behavior, vocalization (squeaking, whistling, screeching, and ultrasound)). If the animals show any signs above, appropriate actions will be taken under the instruction of experts.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

An adverse effect can be biting to the surgical sites. Besides, wound healing complications/ infection, stress from the procedures and handling may also occur.

Explain why these effects may emerge.

After skin surgery the healing process will start. The normal process will consist of moderate inflammation and subsequent tissue repair and remodel. This may cause wound area feeling itchy. Wound healing complications/ infection might occur due to bacteria incubation. Handling is a disturb procedure to their normal life.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound and is not easy to reach even if the animal is awake; if the animals will try to bite the wound, a special designed bandage, [REDACTED], will be used to restrict the head to protect the wound area. The distress due to handling can be minimized by training to act skillfully. The infection will be minimized by using a proper concentration of bacteria.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Topical conditions: the existence of pus or the severe swelling of the wound area.

General condition (including cardiopulmonary condition, weight, hydration status, body temperature), motor function and wound healing (including possible complications, for example infection at the surgical site, formation of an hematoma or active bleeding, dehiscence) will be monitored. If the animals show one or more of the below mentioned signs, euthanasia will be applied prematurely:

1. Cardiopulmonary problems, causing respiratory difficulties.
2. Considerable blood loss, due to bleeding at the surgical site as a complication of surgery or due to unforeseen internal blood loss, causing anaemia or hypovolemic shock.
3. Persistent low body temperature, which could not be reversed, causing discomfort or problems in blood clotting and therefore inducing possible bleedings.
4. Clear signs of dehydration due to lack of intake of water or excessive loss of body fluids due to vomiting or diarrhea, causing discomfort or hypovolemic shock.
5. Decrease in body weight of more than 20%.
6. Severe self-mutilation due to distress.
7. Severe decrease of motor function, causing distress.

Indicate the likely incidence.

Based on the literature (Hart Emily, 2010), the human endpoints stated in section J2 are less than 1% to occur. Historically we do not have animal loss or unexpected complications.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

As this is a relatively simple examination, the expected level of discomfort for the animals in this experiment is presumed to be moderate. This level of discomfort is most likely to occur the first day after surgery due to anesthesia.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

After the experimental time the animals will need to be euthanized to collect the tissue samples.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure Wound healing test in rats

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

A dermal wound healing test is the most commonly used animal test in wound dressing studies, and we could evaluate the wound healing effect of the materials very well through this method, so this is the most suitable animal model for our experiments. After the materials and drugs are optimised in vitro, five different antibacterial materials will be examined in five studies in this animal model as is shown in the diagram in 3.4.1. For each study, four groups (n=6) will be tested, [REDACTED]. Samples from the four groups will be assigned randomly to the four wounds on the dorsum of each rat. Dorsum is chosen to avoid bite or scratching. The wound healing status will be detected in certain time points (week 1, 2, 3, 4) by using photography, histopathology and immunohistochemical methods. The primary parameter is the wound healing speed based on photography. The second parameters are inflammatory cells, epithelial length, capillary density, granulation tissue thickness, collagen density.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Four full thickness skin wounds (extending to the panniculus carnosus) will be created on the back of the rats under standard animal facility inhalation anesthesia (isoflurane). The membranes from different groups [REDACTED] will be used to cover the four wounds randomly. Ring-shaped splints (Outer diameter 22mm, Inner diameter 12mm) will be used to prevent the wounds to constrict, and the wounds will be directly covered with different membranes and secured with 3M Tegaderm films. During the surgery and postoperative, the rats will receive painkillers (Rimadyl). The analgesia is used to mimic the clinical situation and give relieve to the rats although this may have an influence on wound healing. After the procedure, the rats will be housed individually to protect the wound for the whole remains of the experiment. The rats will receive a normal diet and there will be no special housing restrictions. The membranes will be changed at regular time points (based on the in vitro study, e.g. every 4 days) under anesthesia. The skin tissue will be collected after the rats are euthanized at the indicated time points (based on literatures {Lin, Carbohydr Polym,2013; Xie, Acta biomaterialia, 2013}, week 1, 2, 3, 4 because the wound will be healed in one month and we want to detect the wound speed in different time points). The wound healing status will be detected using wound photography, histopathology and immunohistochemical methods. The maximum time the rats will be in experiment is 30 days

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

Sample size will be calculated in line with the requirements of the [REDACTED] and based on the existing literature and the experience of our research group. Sample size is calculated in such a way that the study objectives can be achieved with the lowest number of

animals possible. Calculation will be done with a power analysis. Four skin defects will be created per animal (i.e. two on both side of dorsal skin) to reduce the total number of laboratory animals needed.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Five different antibacterial materials will be examined in five studies in this animal model as is shown in the diagram in 3.4.1. For each study, four groups (n=6) will be tested, [REDACTED]. Samples from the four groups will be assigned randomly to the four wounds on the dorsum of each rat. The rats will be euthanized at various time points based on literature (week 1, 2, 3, 4; n=6). Therefore, the maximum number of the animals in this test is calculated as 120 (5 studies × 4 groups × 6 samples × 4 time points / 4 wounds per rat). Skeletally mature, Wistar or Sprague Dawley rats of both sexes will be used in this project. Rats are the most commonly used animal species to test wound healing effect. From a scientific point of view, this study will show the in vivo performance of the antibacterial membranes in terms of wound healing effect. The wound healing status will be detected in certain time points (week 1, 2, 3, 4) using wound photography, histopathology and immunohistochemical methods.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Wistar or Sprague Dawley Rats, both sexes	registered breeder	120	skeletally mature

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Refinement: This animal study will be performed with the lowest possible discomfort to the animals. Surgery will be performed under standard inhalation anesthesia according to standard [REDACTED]. At the end of surgery and post operation, the animals will receive necessary painkillers. Housing conditions post surgery will be individual to protect the wounds. All the other living standards of the animals will be unaltered.

Replacement: The tissue response to the materials must be assessed in a living organism before they are used clinically. The in vitro liquid test environment is not a replacement to an in vivo environment, in which body fluids (containing many proteins/enzymes), and cellular systems by cell-mediated processes that can affect influence the release of antibacterial drugs and the degradation of the antibacterial material, which may have an influence on wound healing process.

Reduction: A power analysis makes sure the number of animals will be the minimum to still have a reliable experiment. All developed antibacterial materials are tested to be sufficient in vitro on handling properties, i.e. mechanical properties, drug release characteristics, cytotoxicity before they are tested in vivo. Multiple surgical sites will be created per animal, to reduce the total number of laboratory animals needed.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

The surgical procedures will be done under standard [REDACTED], post-operative pain control medication will be given to the animals. The surgical sites are specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected. Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

The animals need to be singly housed to prevent cagemates damaging the wounds, unfortunately we could do nothing to prevent this distress as this is a necessary need for the experiment.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

[X] Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

The standard [REDACTED]) is used to mimic the clinical situation and give relieve to the rats although this may have an influence on wound healing process. The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected. Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort (physiological changes: posture, gait, rapidity of breathing, increased heart rate; Behavioral changes: abnormal behavior, pica-behavior, Hunched back, response to handling or other stimulus Response to hand clapping, aggressive behavior, vocalization (squeaking, whistling, screeching, and ultrasound)). If the animals show any signs above, appropriate actions will be taken under the instruction of experts.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

An adverse effect can be biting to the surgical sites. Besides, single housing will cause distress to the animals. Wound healing complications/ infection, and stress from the procedures and handling may also occur.

Explain why these effects may emerge.

After skin surgery the healing process will start. The normal process will consist of moderate inflammation and subsequent tissue repair and remodel. This may cause wound area feeling itchy. Wound healing complications/ infection might occur due to bacteria infection from environment. Single housing can cause distress because the rats are group animals. Handling is a disturb procedure to their normal life.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound and is not easy to reach even if the animal is awake. Besides, if the animals try to bite the wound area, a special designed bandage, [REDACTED] will be used to restrict the head to protect the wound area.

The distress coming from single housing is unavoidable as this is a necessary in this animal model to protect the wounds. The distress due to handling can be minimized by training to be skilled.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

General condition (including cardiopulmonary condition, weight, hydration status, body temperature), motor function and wound healing (including possible complications, for example infection at the surgical site, formation of an hematoma or active bleeding, dehiscence) will be monitored. If the animals show one or more of the below mentioned signs, euthanasia will be applied prematurely:

1. Cardiopulmonary problems, causing respiratory difficulties.
2. Considerable blood loss, due to bleeding at the surgical site as a complication of surgery or due to unforeseen internal blood loss, causing anaemia or hypovolemic shock.
3. Persistent low body temperature, which could not be reversed, causing discomfort or problems in blood clotting and therefore inducing possible bleeding.
4. Clear signs of dehydration due to lack of intake of water or excessive loss of body fluids due to vomiting or diarrhea, causing discomfort or hypovolemic shock.
5. Decrease in body weight of more than 20%.
6. Severe self-mutilation due to distress.
7. Severe decrease of motor function, causing distress.
8. Severe infection, such as pus in the wound area.

Indicate the likely incidence.

████████████████████, the humane endpoints stated in section J2 are less than 1% to occur. Historically we do not have animal loss or unexpected complications.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

The expected level of discomfort for the animals in this experiment is estimated to be moderate. This level of discomfort is most likely to occur the first day after surgery due to the surgical intervention and recovery from anesthesia.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

After the experimental time the animals will need to be euthanized to collect the tissue samples.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Appendix**Description animal procedures**

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 3	Type of animal procedure Bone-anchored implant antibacterial test in rabbits

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Bone-anchored percutaneous test in rabbits is the most common used, and simplest bone anchored percutaneous animal model. The size of rabbit tibia is also suitable for the implant size, whilst rats would be too small. This animal model is mainly used to detect the long term antibacterial efficacy of the antibacterial patches and sleeves. The patches and sleeves will be put individually or in combination as experiment groups, and the patches and sleeves without drugs will be used as control. The infection status will be evaluated using clinical signs, microbiological methods, and histological staining. Clinical signs of infection will be evaluated weekly according to Checkette et al (R. G. Checketts, 2000). Blood and tissue samples around the implants will be analyzed using microbiological methods to confirm the bacteria infection. Tissue samples will also be histologically evaluated by Brown- Brenn modified Gram stain and hematoxylin and eosin (H&E). The Brown- Brenn stain is used to detect the presence of bacteria, and the H&E stain is used for observing inflammation and fibrosis.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Prefabricated titanium implants will be implanted laterally into the lower tibia of skeletally adult rabbits under [REDACTED]. The antibacterial materials will be used to prevent infection around the percutaneous implants. During the surgery and post operation, the rabbits will receive painkillers. The analgesia is used to mimic the clinical situation and give relieve to the rabbits although this may have an influence on wound healing. The antibacterial materials will be changed at certain time point (based on previous study). As is reported in literature (Tillander, J. 2010; Chou, T.G, 2010; Darouiche, R.O, 2007; Williams, D.2008), the most common bacteria in superficial and deep cultures are Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci, thus 1×10^8 CFU of Staphylococcus aureus will be inoculated at certain time point (from two weeks after operation and weekly after) to standardize the experiment until the end of the experiment. During the procedure, the rabbits will be housed individually to protect the wound from damaging by cagemates. Clinical signs of infection, basical life parameters(i.e. rectal temperatures) will be detected weekly under anesthesia by a modified Checketts Standard (R.G Checketts, 2000). When animals show infection signs of Grade II, they will be taken out of the experiment and euthanized. The rabbits will receive a normal diet and will have no other housing restrictions. After the rabbits are euthanized at Week 24, samples of tissue and blood will be collected to be used for histological and microbiological examination.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

Sample size will be calculated in line with the requirements of the [REDACTED] and based on the existing literature and the experience of our research group. Sample size is calculated in such a way that the study objectives can be achieved with the lowest number of

animals possible. Calculation will be done with a power analysis. Bilateral bone implants will be used per animal (i.e. both side of tibia) to reduce the total number of laboratory animals needed.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

In this test, the groups are a combination of the successful patch and sleeve as follows: (1) no patch or sleeve (2) patch and sleeve (3) patch with drug (4) sleeve with drug, and (5) patch with drug and sleeve with drug. As statistical replicate we chose n=18 based on literature. After the rat studies have given data on the spreading of the data on the antibacterial effect, we will recalculate statistical power to assess whether this size can further be reduced. Therefore, the number of the needed animals is maximum 90 (1 study × 5 groups × 18 × 1 time points). Skeletally mature, New Zealand rabbits of both sexes will be used in this project. The rabbits are the most common used species for this test, as the tibia size is suitable to the bone-anchored part of the implant (Ø2mm), but would be too large for a rat model. From a scientific point of view, this study will show the in vivo performance of the antibacterial membranes in terms of safety (tissue response) and efficacy (antibacterial properties) in a preclinical examination close to the human situation around a percutaneous limb prosthesis.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
New Zealand rabbits, both sexes	registered breeder	90	skeletally mature

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Refinement: This animal study will be performed with the lowest possible discomfort to the animals. Surgery will be performed under standard inhalation anesthesia according to the standard [REDACTED]. At the end of surgery and operation, the animals will receive necessary painkillers. Housing will be individual but all living standards of the animals will be unaltered.

Replacement: The tissue response to the materials must be assessed in a living organism before they are used clinically. The tissue response to the materials must be assessed in a living organism before they are used clinically. The in vitro liquid test environment is not a replacement to an in vivo environment, in which body fluids (containing many proteins/enzymes), and cellular systems by cell-mediated processes that can affect influence the release of antibacterial drugs and the degradation of the antibacterial material. Animal studies are required to investigate tissue biocompatibility and efficacy of the antibacterial effect.

Reduction: A power analysis makes sure the number of animals will be the minimum to still have a reliable experiment. All developed antibacterial materials are tested to be sufficient in vitro on handling properties, i.e. mechanical properties, drug release characteristics, cytotoxicity before they are tested in vivo. If possible, bilateral defects will be created to reduce the total number of laboratory animals needed.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

The surgical procedures will be done under [REDACTED] and post-operative pain control medication will be given to the animals. The animals will be housed individually to prevent the cross infection and protect the surgical areas. The surgical sites are specifically chosen based on scientific literature, indicating no undesirable effects are expected. Animals will be checked by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems according to a modified Checketts standard (R.G Checketts, 2000), unexpected increase of distress, or an increased level of discomfort (e.g. physiological changes: posture, gait, rapidity of breathing, increased heart rate; Behavioral changes: abnormal behavior, pica-behavior, aggressive behaviors). Once the animals show any signs above, appropriate actions will be taken under the instruction of experts.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

The animals need to be singly housed to prevent cagemates damaging the wounds, unfortunately we could do nothing to prevent this distress as this is a necessary need for the experiment.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

H. Pain and pain relief

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

The standard XXXXXXXXXX) will be used and distress after the intervention is not predictable. The analgesia (Rimadyl) is used to mimic the clinical situation and give relieve to the rabbits although this may have an influence on wound healing process. The surgical sites are specifically chosen; therefore, no undesirable effects are expected. Animals will be checked by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems according to a modified Checketts standard(R.G Checketts, 2000), unexpected increase of distress, or an increased level of discomfort (e.g. physiological changes: posture, gait, rapidity of breathing, increased heart rate; Behavioral changes: abnormal behavior, pica-behavior, aggressive behavior). If the animals show any signs above, appropriate actions will be taken under the instruction of experts. Once the humane end point is reached, the animal will be euthanized.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

The severe infection of implant area might happen. Besides, single housing, stress from the procedures and handling may also occur.

Explain why these effects may emerge.

Anti-infection is the main purpose of this study. The infection around the implant is created by bacteria incubation after the implant is planted surgically to that area. If the infection gets out of control, the severe infection may happen. Single housing can cause distress because the rabbits are group animals. Handling is a disturb procedure to their normal life.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

To avoid discomfort, analgesic medication will be given to the animals. The concentration of bacteria will be based on the literature and previous experience. A pilot study will be conducted to evaluate the safety of that concentration. Animals will be checked daily to detect the abnormal behavior and weekly under anesthesia by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of infection. Once there is infection above grade 2 (according to a modified Checketts standard{R.G Checketts, 2000}, shown in the human endpoint), the animals will be euthanized. The distress coming from single housing is unavoidable as this is a necessary in this animal model to protect the wounds. The distress due to handling can be minimized by training to act skilled.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Topical conditions in the wound area:

The animals with infection grade 2 will be euthanized. Pin tract infections will be evaluated using a modified Checketts et al (R.G Checketts, 2000). Classification method for animal experiments: Grade 0 corresponds to "no redness," in which neither redness, discharge, nor pin loosening is observed. Grade 1 corresponds to infections only in the soft tissue, characterized by redness and discharge around the pin without pin loosening. Grade 2 corresponds to infections in both soft and hard tissues, characterized by redness and discharge around the pin associated with pin loosening due to osteomyelitis.

General condition (including cardiopulmonary condition, weight, hydration status, body temperature), motor function and wound healing (including possible complications, for example infection at the surgical site, formation of an hematoma or active bleeding, dehiscence) will be monitored. If the animals show one or more of the below mentioned signs, euthanasia will be applied prematurely:

1. Cardiopulmonary problems, causing respiratory difficulties.
2. Considerable blood loss, due to bleeding at the surgical site as a complication of surgery or due to unforeseen internal blood loss, causing anaemia or hypovolemic shock.
3. Persistent low body temperature, which could not be reversed, causing discomfort or problems in blood clotting and therefore inducing possible bleedings.
4. Clear signs of dehydration due to lack of intake of water or excessive loss of body fluids due to vomiting or diarrhea, causing discomfort or hypovolemic shock.
5. Decrease in body weight of more than 20%.
6. Severe self-mutilation due to distress.
7. Severe decrease of motor function, causing distress.

Indicate the likely incidence.

The conditions of the humane endpoints stated in section J2 are approximately 20%-40% to occur (1 to 2 out of 5 groups without drugs * 100% expected incidence of humane end-points). Because this may happen to the control and the experiment group without antibacterial drugs, and once signs of Grade 2 clinical infection manifest in any implant, at which point the animal will be euthanized.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

The expected level of discomfort is moderate to severe. This level of discomfort is most likely to occur in the days after the surgery due to recovery from anesthesia and due to bacterial infection in the late stage. [The estimated percentage of animals experiencing severe distress is maximally 40% \(2 out of 5 groups\)](#). Once this severe discomfort occurs the animals will be taken out of the test, i.e. if the infection status is above grade 2, the animal will be euthanized. [The rest of animals \(minimally 60%\) are expected to experience moderate distress.](#)

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

After the experimental time the animals will need to be euthanized to collect the tissue samples.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0072
2. Titel van het project: Prevention of infection around skin penetrating limb prostheses.
3. Titel van de NTS: Voorkomen van wondinfecties rond prothesen.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 21-05-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 02-06-2015 en 07-07-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 08-06-2015 tot 22-06-2015 en van 13-07-2015 tot 14-07-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 22-06-2015 en 14-07-2015
 - advies aan CCD: 04-09-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 08-06-2015
 - Strekking van de vragen:
 -
 - **Project Proposal:**
 - -3.1. De projectaanvraag is gebaseerd op de noodzaak tot vermindering van de infectiefrequentie van endo-exoprothesen, omdat deze infecties kunnen resulteren in verlies van het implantaat. Uit de studie waarnaar de onderzoekers verwijzen (9) blijkt inderdaad dat 18% van de 39 patiënten een infectie doormaakt, maar dit resulteert niet per definitie in verwijdering van het implantaat. Hebben de onderzoekers meer voorbeelden van studies waaruit blijkt dat endo-exo femurprothesen vaak verwijderd moeten worden door het

optreden van infecties? In een artikel uit 2012 (Aschoff en Juhnke) schrijft de ontwerper van de techniek 'Initially high rates of infection could be dramatically reduced through a change in design of the skin-penetrating parts'. Kennelijk kan de prevalentie van infecties afnemen door de vorm van de prothese aan te passen. De commissie ziet voornamelijk in de gegeven achtergrond te weinig onderbouwing voor het klinische probleem en voor de voorgestelde (belastende) dierexperimenten. De onderzoekers worden verzocht deze onderbouwing te versterken.

- -3.4 Indien de oplosbaarheid in het lichaam en de 'biocompatibiliteit' van de onderzochte materialen onvoldoende is, hoeft het effect van de materialen op wondgenezing niet bepaald te worden. De commissie verzoekt de onderzoekers een fasering in de volgorde van de testen aan te brengen, opdat materialen niet onnodig in het wondgenezingsexperiment getest worden.
- -3.4.2.
- *De onderzoekers schrijven dat zij 5 verschillende antibacteriële materialen willen onderzoeken. Waarom kiezen zij voor dit aantal, hoe verschillen zij en worden deze gelijktijdig of sequentieel onderzocht?
- *Kunnen de onderzoekers duidelijker uitleggen wat Kirby-Bauer testen inhouden en waarom zij deze willen toepassen?
- *De biocompatibiliteit van de materialen wordt eerst in ratten getest, waarna de materialen in konijnen worden getest. Is de biocompatibiliteit voor konijnen naar verwachting hetzelfde als voor ratten? De onderzoekers worden verzocht dit beter toe te lichten.
- *Een ander aspect van de aanvraag betreft de antibacteriële werking van de materialen al dan niet in combinatie met antimicrobiële agentia. Welke bacteriestammen willen de onderzoekers gebruiken en zijn dit dezelfde als de bacteriën die in de kliniek de meeste problemen geven bij endo-exoprothesen?
- **Description of Animal Procedures:**
- -DAP1, onderdeel B. Er worden 4 huidlaesies aangebracht op de rug van elke rat. Het effect op wondgenezing van 5 materialen in 4 condities wordt onderzocht. Kunnen de onderzoekers duidelijker opschrijven welke materialen en welke condities per rat onderzocht zullen worden?
- -DAP2, onderdeel B. Er worden twee onderhuidse pockets aangebracht per rat om de biocompatibiliteit en het antibacteriële effect van het materiaal te onderzoeken. Kunnen de onderzoekers duidelijker opschrijven welke materialen en welke condities (geen materiaal, materiaal zonder bacteriën, materiaal met bacteriën) per rat onderzocht zullen worden?
- -DAP2, onderdeel A. Op grond van welke criteria worden de antibacteriële materialen gekozen voor deze dierstudie? De onderzoekers zullen bijvoorbeeld *S. Aureus* gebruiken om de materialen mee te infecteren. Waarop is de keuze voor deze stam gebaseerd, en welke andere bacteriën willen de onderzoekers mogelijk gebruiken? Hebben de onderzoekers overwogen om een multi-bacterieel preparaat te gebruiken waarin de bacteriestammen vertegenwoordigd zijn die pathologie bij patiënten veroorzaken? Om het antibacteriële effect van de onderzochte materialen te kwantificeren zullen de onderzoekers de overgebleven bacteriën in het membraan tellen en de overgebleven antibacteriële werking van de membranen zal in zgn. Kirby-Bauer tests worden bepaald. De commissie wil graag weten of deze methodes al eerder gebruikt zijn door deze onderzoekers en of de antibacteriële werking hiermee goed te kwantificeren is.

- -DAP3, onderdeel A, tweede vraag. De onderzoekers vermelden niet welke bacteriën ze willen gebruiken en waarom deze stam(men). Zij worden verzocht dit toe te voegen. Voorts wordt niet duidelijk welk aantal bacteriën op basis van eigen onderzoek of de literatuur hiervoor gebruikt zal worden. Hebben de onderzoekers wel ervaring met het aanbrengen van infecties bij dit konijnenmodel? Op welke tijdstippen tot 24 weken willen de onderzoekers hoeveel konijnen doden? In de berekening van het aantal dieren wordt geen rekening gehouden met het doden van dieren op verschillende tijdstippen.
- -DAP3, onderdeel B. Kunnen de onderzoekers duidelijker opschrijven welke condities zij precies in elk konijn gaan onderzoeken? De benodigde groepsgrootte varieert van 8 tot 18 dieren. Waarom varieert dit zo sterk? Indien de onderzoekers kunnen volstaan met groepen van 8 dieren dan levert dit een grote reductie van het benodigde aantal dieren op.
- -DAP3, onderdeel K. De konijnen worden pas uit het experiment gehaald indien de infectiestatus 'Grade 2' overstijgt. Dit veroorzaakt ernstig ongerief voor de dieren. De dieren worden gedurende het experiment meerdere malen geïnfecteerd, waardoor er een gerede kans is op het ontstaan van dergelijke infecties met ernstig ongerief bij dieren die materialen zonder antibacteriële middelen krijgen. De onderzoekers worden verzocht het geschatte percentage dieren dat ernstig ongerief zal ervaren toe te voegen.
- Datum antwoorden: 22-06-2015
- Strekking van de antwoorden:
- **Project Proposal:**
- 3.1-Response: We apologize for the mistake of removal rate of the implants. However, the infection rate of the endo-exo prostheses is still very high based on the literature, e.g. 13%–30% (Aschoff, H.H., 2012; Aschoff, H.H., 2010) and 18%–23% (Hagberg, K.,2009; Tillander J, 2012). Although this infection does not always result in implant loosening, revision and/or even removal of the implant, it still is a major cause of pain, medication, and prolonged hospital time for the patient group (revised in the application). Although Aschoff and Juhnke reported that the prevalence of infections can be reduced by adjusting the shape of the prosthesis in 2012, exit-site infections remain one of the main complications for percutaneous devices (Johannes Großhauser, 2015). The approach we adopt in this study, i.e. using antibacterial patch and sleeve, will also be potentially applicable for the other types of percutaneous devices, such as permanent catheters, orthopaedic fixation devices, drivelines for ventricular assist devices etc.
- 3.4-Response: We fully understand the concern. To make the research strategy more clear, we added a diagram showing the procedures. This procedure diagram has been added to the application form in 3.4.1. The related text has also been changed accordingly.
- 3.4.2. Response: The whole procedure is shown in the figure in the 3.4.1. The number of study is chosen based on the consideration that research may encompass with some risk of failure. We cannot try infinitely, but 5, as a realistic number, is chosen as the limitation for this study. The experiment will be examined sequentially as shown in the diagram.
- 3.4.2-Response: The Kirby-Bauer test is the other name of agar diffusion test, which is the most widely used antibacterial test. In Kirby-Bauer test, the materials will be placed on an agar plate inoculated with relevant bacteria. After 18 to 24 hours, there will be a transparent circle area around the material if the material has an antibacterial effect. The size of the transparent area is correlated to the antibacterial efficacy. In this Kirby-Bauer test, we intend to evaluate whether the materials are still effective after predetermined time of in vivo

experiment. This is important to know, as there is no antibacterial effect after the experiment, then this means that the patches should be replaced more frequently.

- 3.4.2-Response: Response: The biocompatibility of the materials tested in rats is a representation of that in larger animals and humans. As we cannot use rats to perform the procedure described in the test III due to the size of implants, we have to choose larger animals, e.g. rabbits. Besides, this model is constructed by [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]), thus we have previous experience working with this animal model.
- 3.4.2-Response: Response: We prefer a standardized test by using one strain of bacteria. As reported in literature (Tillander, J. 2010; Chou, T.G, 2010; Darouiche, R.O, 2007; Williams, D.2008), the most common bacteria in superficial and deep cultures are Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci. Therefore, S. aureus is chosen in this experiment.
- **Description of Animal Procedures:**
- DAP 1, onderdeel B.-Response: The materials is shown in the diagram in 3.4.1. Maximally five studies will be conducted. In each study, the groups will be [REDACTED] [REDACTED]
- DAP 2, onderdeel B. Response: The materials is shown in the diagram in 3.4.1. Maximally five studies will be conducted. In each study, the groups will be [REDACTED] [REDACTED]
- DAP 2, onderdeel A. Response: In this project, we will start to test chitosan based materials for the reason that chitosan and its derivatives have attracted much attention as antimicrobial agents against fungi, bacteria and viruses. As chitosan alone may not fulfil the requirement to be used as patches or sleeves, we will further modify this material to 1) improve the mechanical properties, and 2) achieve a sustained release of drugs. As is reported in many literatures (Tillander, J. 2010; Chou, T.G, 2010; Darouiche, R.O, 2007; Williams, D.2008), the most common bacteria in superficial and deep cultures were Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci. Therefore, S. aureus is chosen in this experiment. We will not choose the other bacteria in this study, because multi-bacterial composition is hard to standardize. Although this model is constructed by our group leader, [REDACTED] [REDACTED]), our group has never used this setup (bacteria inoculation) before. But this method has been reported in literature (Hart E., 2010; Park S.U., 2014), where the test materials were similar to our samples. Therefore, we adopt it as a quantification method.
- DAP 3, onderdeel A, tweede vraag. Response: The choice of the stain of bacterial is based on the same reason that we explained in DAP2. Besides, 1×10^8 CFU of S. aureus will be used in this study based on literature (Chou, T.G, 2010; Williams, D.2008). This has been added to the application test. Besides, this model is constructed by our group leader, [REDACTED] [REDACTED] thus we have previous experience working with this animal model, however, we did not incubate bacteria in this model before in our lab. Only one time point (24 weeks) will be included. The text has been changed to make it clear.

- DAP 3, onderdeel B- Response: The conditions of detection has been shown in A1. The infection status will be evaluated using clinical signs, microbiological methods, and histological staining. Clinical signs of infection will be evaluated weekly according to Checkette et al (R. G. Checketts, 2000). Blood and tissue samples around the implants will be analyzed using microbiological methods to confirm the bacteria infection. Tissue samples will also be histologically evaluated by Brown- Brenn modified Gram stain and hematoxylin and eosin (H&E). The Brown- Brenn stain is used to detect the presence of bacteria, and the H&E stain is used for observing inflammation and fibrosis.
The required group size is based on literature, where some groups experienced high failure rates. We choose 18, the highest group size for calculation. However, This number may be changed based on our pilot study in the future. To avoid confusion, we changed the animal number to only mention 18 for now in the application.
- DAP3, onderdeel K. Response: one group of animals receives materials without antibacterial agents. They are likely to reach the humane endpoints. Therefore, the estimated percentage of animals experiencing severe distress is 15% (1/7 group). As the animals will be euthanized at humane-end points, this is not supposed to increase the distress level of the whole study.
-
- Datum: 13-07-2015
- Strekking van de vragen:
- **Description of Animal Procedures:**
- -DAP3, onderdeel B: Welke behandeling ondergaat de sham groep? De onderzoekers worden verzocht dit duidelijker op te schrijven. De onderzoekers willen de antibacteriële effectiviteit van patches en sleeves onderzoeken. Welke onderzoeksvraag willen de onderzoekers beantwoorden met de groepen waarin zowel een patch als sleeve wordt gebruikt maar waarin één van beide zonder medicijn wordt gebruikt (patch + drug and sleeve – drug, patch – drug and sleeve + drug? Verwachten zij dat deze combinaties in de praktijk gebruikt zullen worden? Zij worden verzocht de rationale voor het includeren van deze groepen toe te lichten, of deze groepen te verwijderen uit de aanvraag en het totaal aantal konijnen met 36 te reduceren.
- -DAP3, onderdeel K: De onderzoekers worden verzocht de laatste zin te schrappen (As the animals... the whole study) en aan te geven welk percentage van de konijnen matig ongerief zal ervaren en welk percentage ernstig ongerief. Tevens worden zij verzocht deze informatie te verwerken in de niet-technische samenvatting bij onderdeel 3.5.
- Datum antwoord: 14-07-2015
- Strekking van de antwoorden:
- DAP3, onderdeel B Response: We agree with the comments, and have changed to 5 groups as suggested. The groups now are clearly described in the application form. The scientific question is to explore the long-term antibacterial effect from our materials or drugs, but also where the drug can be best applied (hence the groups). The animal number is reduced by 36, and the related content has been changed accordingly throughout the proposal.
- DAP3, onderdeel K Response : The last sentence was removed as suggested. The expected discomfort level is moderate to severe. The percentage of severe would be maximally 40% (2/5 group) and the percentage of moderate would be 60% (3/5 group). The content in 3.5 has also been changed accordingly.

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to develop an effective strategy to prevent the occurrence of short as well as long term infections of percutaneous implants. The end goal is to provide a safe and cost-efficient treatment when using bone-anchored prostheses.' Prothesen die verankerd zijn in het bot, zogenaamde endo-exoprothesen, hebben veel voordelen voor de patiënt zoals minder irritatie aan de stomp en verbeterde functie van de prothese. Een belangrijk nadeel is de hogere incidentie van infecties doordat de huid niet meer intact is. Dergelijke infecties kunnen leiden tot ongewenste speling in, en uiteindelijk tot het verlies van, de prothese. Een dergelijke infectie kan ook anderszins tot ernstige complicaties leiden. Met betere infectiepreventie is daarom veel gezondheidswinst te behalen voor mensen met endo-exoprothesen. De veiligheid en werkzaamheid van een nieuw ontwikkeld antimicrobieel materiaal op basis van chitosan – al dan niet in combinatie met medicijnen - wordt in dit project uitgetest bij ratten. Voorts wordt duidelijk of manchetten en lapjes van dit materiaal – al dan niet in combinatie met medicijnen - effectief zijn ter preventie van infecties rond prothesen bij konijnen. De te behalen onderzoeksresultaten zullen een indicatie geven van de mogelijke toepassing van dit materiaal bij mensen met een endo-exoprothese. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot effectievere infectiepreventie voor mensen met een endo-exoprothese of andere transdermale producten. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de resultaten kunnen bijdragen aan een betere kwaliteit van leven voor mensen die een ledemaat missen. Hun prothesen zullen beter en met minder complicaties kunnen functioneren, waardoor hun deelname aan het maatschappelijk verkeer zo min mogelijk belemmerd wordt. De commissie acht dat van substantieel belang.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak zijn wetenschappelijk verantwoord en kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De betrokken onderzoeksgroepen hebben ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven.

De proeven in de beide diersoorten volgen logisch op elkaar. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over de veiligheid en werkzaamheid van een nieuw te ontwikkelen antimicrobieel materiaal op basis van chitosan, en het effect van toevoeging van medicijnen aan dit product. Deze resultaten geven een goede indicatie van de toepassingsmogelijkheid bij mensen met endo-exoprothesen.

5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief voor de ratten wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het subcutaan of in een huidwond aanbrengen van het materiaal, al dan niet in combinatie met een bacteriële infectie, en de pijn en hinder tijdens de genezing van de huid. Het ongerief voor de konijnen wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het aanbrengen van een endo-exoprothese, het aanbrengen van het materiaal in het wondgebied -al dan niet in combinatie met een bacteriële infectie -, en de pijn en hinder tijdens de genezing hiervan. De DEC schat het ongerief als gevolg van het regelmatig inspecteren van de wonden onder anesthesie en de individuele huisvesting in als licht, het ongerief als gevolg van de benodigde operaties schat de commissie in als matig. Het ongerief als gevolg van botinfecties (optredend bij maximaal 40% van de konijnen) schat de commissie in als ernstig. Het cumulatief ongerief voor de dieren in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De onderdelen van het project die in vitro uitgevoerd kunnen worden zijn al uitgevoerd, voor de resterende onderzoeksvragen is onderzoek in de beschreven diermodellen noodzakelijk. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door de stapsgewijze aanpak met go / no go momenten en het aanbrengen van meerdere subcutane pockets, huiddefecten of endo-exoprothesen per dier, wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 600 ratten en 90 konijnen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. De dieren zullen adequate pijnbestrijding ontvangen tijdens en na de operaties. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwachte, ernstige complicaties tijdig kan worden ingegrepen. Het ernstige ongerief als gevolg van de optredende botinfecties in de controle groepen wordt zo kort mogelijk gehouden door het toepassen van een humaan eindpunt. Het ongerief is echter niet geheel te voorkomen, omdat het doel van het onderzoek is aan te tonen dat de te testen materialen dit soort infecties kunnen voorkomen. Verdere verfijning zou het behalen van die doelstelling verijdelen. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in de vraag welk antimicrobieel materiaal op basis van chitosan voldoende veilig en effectief is om toe te passen bij wondgenezing, al dan niet in combinatie met medicijnen. De resultaten geven een indicatie of deze materialen bij mensen gebruikt kunnen worden ter preventie van infecties van endo-exoprothesen. Het is aannemelijk dat dit onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen van effectievere infectiepreventie voor mensen met een endo-exoprothese of andere transdermale producten. Endo-exoprothesen zorgen voor betere functionaliteit dan traditionele prothesen. Met betere infectiepreventie bij endo-exoprothesen is daarom veel gezondheidswinst te behalen voor mensen die een ledemaat missen. Het belang van het beschikbaar komen van een dergelijk materiaal acht de DEC substantieel.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 100% van de ratten en 60% van de konijnen matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van het subcutaan of in een huidwond aanbrengen van het antimicrobiële materiaal of het aanbrengen van een endo-exoprothese. Voor 40% van de konijnen kan het ongerief toenemen tot ernstig als gevolg van botinfecties. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015241

Bijlagen

2

Datum 25 september 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 10 september 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015241. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Radboud Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: ██████████
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ██████████
Functie: researcher
Afdeling: ██████████
Telefoonnummer: ██████████
E-mailadres: ██████████

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101 [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag
- Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 10 oktober 2015
Geplande einddatum: 10 april 2019
Titel project: Prevention of infection around skin penetrating limb prostheses
Titel niet-technische samenvatting: Voorkomen van wondinfecties rond prothesen
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: Melding Machtiging
 DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Nijmegen
Datum: 10 september 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015241

Bijlagen

2

Datum 25 september 2015
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 25 september 2015
Vervaldatum: 25 oktober 2015
Factuurnummer: 15700241
Ordernummer: 040823-461220 /2015-0072 /

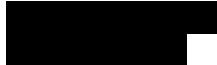
Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015241	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015241

Datum 28 september 2015
Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 10 september 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Prevention of infection around skin penetrating limb prostheses met aanvraagnummer AVD103002015241. Uw aanvraag wordt in behandeling genomen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Wanneer een beslissing

Wij nemen uiterlijk 4 november 2015 een beslissing. Omdat een DEC-advies is meegestuurd met de aanvraag, streven wij ernaar om de aanvraag binnen 20 werkdagen te beslissen. Als wij nog informatie nodig hebben, kan dit later worden. Voor een complexe aanvraag staat een langere termijn. In beide gevallen ontvangt u daarover bericht. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015241

15 OKT 2015

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 10 september 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Prevention of infection around skin penetrating limb prostheses" met aanvraagnummer AVD103002015241. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "Prevention of infection around skin penetrating limb prostheses" starten. De vergunning wordt afgegeven van 15 oktober 2015 tot en met 10 april 2019.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 4 september 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. De CCD stelt echter enkele algemene voorwaarden.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

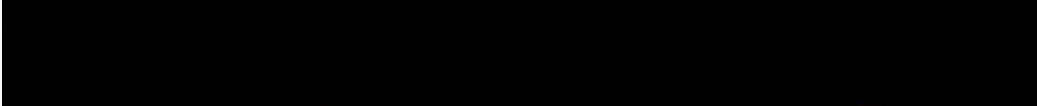
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Vergunning
- Hiervan deel uitmakend:
 - DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Radboud Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 15 oktober 2015 tot en met 10 april 2019, voor het project "Prevention of infection around skin penetrating limb prostheses" met aanvraagnummer AVD103002015241, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is researcher. Voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 Een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 10 september 2015
- 2 De bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 september 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 september 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 4 september 2015, ontvangen op 10 september 2015.
 - d Uw aanvullingen, zoals ontvangen op 2 oktober 2015.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Subcutaneous test in rats	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wistar of Sprague Dawley ratten	480	Matig / moderate	
Wound healing test in rats	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wistar of Sprague Dawley ratten	120	Matig / moderate	
Bone-anchored implant antibacterial test in rabbits	Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) / New Zealand rabbits	90	Ernstig / severe	Maximaal 40% van de dieren ernstig. Overige matig.

Voorwaarden**Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen**

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten de goedkeuring van de IvD hebben gekregen.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Voorschriften

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Wegens ernstig ongerief bij een aantal van de konijnen is beoordeling achteraf nodig. De informatie dient uiterlijk 10 april 2020 te worden ingediend bij de CCD.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand..

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden. In dit project worden dierproeven toegepast waarbij die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 2019 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van

het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van lijden van de proevendieren conform de vergunning waren.

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 15 oktober 2015 16:53
Aan: [REDACTED]
[REDACTED]
Onderwerp: Beslissing projectvergunning dierproeven
Bijlagen: Beslissing projectvergunning dierproeven AVD103002015241.pdf

Geachte [REDACTED]

Op 10 september 2015 hebben wij u aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project: Prevention of infection around skin penetrating limb prostheses met aanvraagnummer AVD103002015241. [Hierbij ontvangt u de beslissing van dit project.](#) De brief wordt per post verzonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl
[REDACTED]

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.