

	Inventaris Wob-verzoek W16-22S								
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015413								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel oud			x					
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud			x					
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	DEC-advies				x		x	x	
9	Projectvoorstel herzien			x					
10	Niet-technische samenvatting herzien	x							
11	Bijlage beschrijving dierproeven 1 herzien			x					
12	Bijlage beschrijving dierproeven 2 herzien			x					
13	Bijlage beschrijving dierproeven 3 herzien			x					
14	Advies CCD		x						x
15	Beschikking en vergunning				x		x	x	



31 MAART 2016

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>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 90500 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde KvK-nummer Straat en huisnummer Postbus Postcode en plaats IBAN Tenaamstelling van het rekeningnummer	BioXpert B.V. 54838134 Nistelrooise Baan 3 5374RE Schaijk NL72RABO0183605888 BioXpert BV
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>		
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer E-mailadres	
		☒ Dhr. ☐ Mw.	
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer E-mailadres	
		☐ Dhr. ☒ Mw.	

- 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 - 5 - 2016

Einddatum 30 - 4 - 2021

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Uittesten van veiligheid van respiratoire humane challenge virussen in verschillende proefdier modellen

- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Testen van de veiligheid van bovenste luchtweg virussen bestemd voor humaan gebruik in muizen, katoenratten en fretten.

- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?

Naam DEC

Postadres

E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1441 Lege
☐ Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
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.
☐ Via een eenmalige incasso
☒ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

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 1.7). 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 

Functie 

Plaats Schaijk

Datum 29-03 - 2015

Handtekening 



Format

Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 90500
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. BioXpert
- 1.3 Vul de titel van het project in. Uittesten van veiligheid van respiratoire humane challenge virussen in verschillende proefdier modellen

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- ☒ Fundamenteel onderzoek
- ☒ Translationeel of toegepast onderzoek
- ☒ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- ☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- ☐ Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- ☐ Hoger onderwijs of opleiding
- ☐ Forensisch onderzoek
- ☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

In het kader van de ontwikkeling van interventie strategieën tegen respiratoire virussen (in het bijzonder influenza, respiratoir syncytieel virus en rhinovirus) biedt de aanvrager van dit projectvoorstel verschillende preklinische modellen aan om de veiligheid van deze interventie strategieën uit te testen. Daarnaast kunnen deze modellen ook gebruikt worden om virus stocks van bovengenoemde virussen uit te testen op hun veiligheid voor humaan gebruik (zogenaamde humane challenge modellen). Deze preklinische modellen zijn door de aanvrager opgezet of voor de aanvrager beschikbaar en kunnen gebruikt worden om virus stocks verschaft door derden (in het algemeen farmaceutische bedrijven), maar ook in huis geproduceerd uit te testen.

Bovengenoemde virussen zorgen jaarlijks voor een grote ziektelast ondanks het feit dat er bijvoorbeeld een actief jaarlijks vaccinatie beleid is tegen seizoens influenza. Tot een aantal jaar geleden werden interventie strategieën alleen uitgetest in preklinische modellen, echter in de afgelopen jaren is zeker voor relatief milde respiratoire virus infecties ook het humane challenge model in opkomst. Het grote voordeel van dit model is de controleerbaarheid van de studie. Dit in tegenstelling tot een grote klinische studie waarbij het moeilijk is om te voorspellen bij welk aantal deelnemers significantie bereikt wordt in de test resultaten tussen specifiek behandelde en placebo behandelde deelnemers. Daarbij is het soms onduidelijk of de betreffende deelnemer een infectie heeft opgelopen omdat een actief virologisch screeningsbeleid op alle deelnemers logistiek moeilijk is. Bij een humane challenge waarbij een interventie strategie uitgetest wordt, kunnen de deelnemers uitvoerig gescreend worden en is van alle deelnemers bekend of ze geïnfecteerd zijn en dus of de interventie strategie gewerkt heeft.

De virussen die tot nu toe hiervoor in aanmerking komen zijn:

- Milde humane influenza virussen (zogenaamde seizoens influenza virussen)
- Humaan respiratoir syncytieel virus
- Humaan rhinovirus

Van deze bovenstaande virussen moeten voor de humane challenge speciale virusstocks opgegroeid worden in geschikte en goedgekeurde cellijnen. Het is echter niet gegarandeerd dat het relatief milde karakter voor opgroeien in vitro nog van toepassing is na het maken van de humane challenge stock. Alhoewel de mutatie frequentie van deze RNA virussen in het algemeen relatief hoog is zeker onder druk van het immuunsysteem, is dit minder van toepassing voor in vitro opgroeien van virus. Desondanks dienen dergelijk opgegroeide virusstocks uitgetest te worden op hun veiligheid al dan niet in vergelijking met het oorspronkelijke donor virus. Deze laatste keuze zal voornamelijk bepaald worden op beschikbaarheid van dit oorspronkelijke virus. Indien dit een primair isolaat is van een patiënt zal meestal niet voldoende materiaal aanwezig zijn of is de titer van het materiaal niet hoog genoeg om het ook in een dierstudie te gebruiken. Betreft het reeds een bestaande virus stock, dan zou het kunnen zijn dat het oorspronkelijke virus wel degelijk meegenomen kan worden. Indien het oorspronkelijke virus niet beschikbaar is, zal een vergelijkbaar virus (positieve controle) meegenomen worden ter controle.

De lage pathogeniciteit van de opgegroeide challenge stock voor humaan gebruik dient bevestigd te worden in één of meerdere diermodellen, waarbij het kleinste diermodel gekozen wordt dat het meest representatief is voor de gekozen primaire uitleesparameter. In het algemeen staat omschreven in de Pharmacopeia waaraan degelijk biologische reagentia voor humaan gebruik moeten voldoen, maar voor deze specifieke vraagstelling bestaan geen vereisten. Als richtlijn zullen opgegroeide virus stocks voor humane challenge niet pathogener mogen zijn of niet leiden tot hogere viral load dan het oorspronkelijke virus of de positieve controle. Op basis van de resultaten verkregen in de verschillende dierexperimente, die beschreven zijn in deze aanvraag, kan een uitspraak gedaan worden over de veiligheid van de hier uit te testen virus stocks. In het geval van een humane influenza virus stock bestaat een wetenschappelijke publicatie van Memoli et al. (Clinical Infectious Diseases 2015, Appendix 1) waarin omschreven staat hoe de auteurs het betreffende virus hebben uitgetest. Voor de andere twee bovengenoemde virussen bestaat niet zo'n richtlijn/publicatie, echter gepubliceerd werk en eigen onderzoek heeft wel de gevoeligheid van de voorgedragen diermodellen voor deze virussen bevestigd.

De experimenten zoals hier beschreven hebben een kwantitatief karakter, resultaten verkregen binnen

de experimenten met verschillende doses van het virus of tussen het oorspronkelijke virus (al dan niet uit historische resultaten) en het opgegroeide virus zullen direct met elkaar vergeleken worden. De voorwaarde voor alle experimenten ongeacht de primaire uitleesparameter zal zijn dat de virus stock voor humane challenge geen significant hogere bevindingen wat betreft virulentie of pathogeniciteit mag hebben dan het oorspronkelijke virus of de meegenomen positieve controle. Deze bevindingen zijn afhankelijk van het virus en het gekozen diermodel.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

De algemene doelstelling van het project is het uittesten van de veiligheid van humane respiratoire virussen voor humane challenge door middel van een kwantitatieve bepaling. De primaire uitleesparameter zal afhangen van de combinatie van preklinisch model en virus. Per combinatie van preklinisch model en virus is de primaire uitleesparameter beschreven in de verschillende bijlagen bij dit projectvoorstel. Voor de kleine diermodellen (muizen en katoenratten) zal de primaire uitleesparameter de virologie zijn, namelijk viral load in de longen na infectie. Voor de fretten zal de primaire uitleesparameter pathologie zijn in de longen.

Dit soort studies worden door de aanvrager uitgevoerd om te kunnen voldoen aan de vraag van derden om de veiligheid van humane respiratoire virussen voor humaan gebruik uit te testen en om advies uit te brengen richting regelgevende instanties. Vanwege de grote expertise van de aanvrager op het gebied van humane respiratoire virussen en haar relevante preklinische modellen kunnen dergelijke studies ook leiden tot publicatie in peer-reviewed tijdschriften. Deze expertise leidt tot een toename van de kwaliteit van het te gebruiken model en het ontwikkeltraject van de betreffende interventie strategie.

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Virale bovenste luchtweginfecties zorgen jaarlijks voor een hoge ziektelast en deze zorgen voor een hoge economische schade. Als voorbeeld: voor alleen de Verenigde Staten, een samenleving vergelijkbaar met West-Europa, is uitgerekend dat de economische schade voor niet-influenza bovenste luchtweg infecties op kan lopen tot 40 miljard dollar (Fendrick Archiv Intern Med 2003). Hierin zijn (al dan niet effectieve en relevante) directe medische kosten meegenomen, maar ook indirecte kosten, zoals bijvoorbeeld het opnemen van vrije dagen door ouders met kinderen die een infectie doormaken. Daarbovenop kunnen bij de zogenaamde risicogroepen (baby's, jonge kinderen, bejaarden, chronisch zieken en patiënten met een verzwakt afweersysteem) ernstige complicatie optreden en zelfs sterfte voorkomen.

Vanwege het feit dat deze bovenste luchtweginfecties een hoge ziektelast en een hoge economische schade veroorzaken, zoeken farmaceutische bedrijven naar interventie strategieën om deze te verlagen. Tevens kunnen deze interventie strategieën ook ingezet worden bij ernstigere ziektebeelden in risico groepen.

Hoewel het uittesten in preklinische modellen een belangrijke stap is in de vrijgave van dergelijke interventie strategieën, wordt steeds vaker het humane challenge model gebruikt in dergelijk onderzoek. Hierbij speelt ook mee dat deze relatief milde infecties ook een beperkt ziektebeeld vertonen in de verschillende preklinische modellen, waardoor het soms lastig is om een behandelingseffect aan te tonen in deze niet natuurlijke gastheren.

De resultaten verkregen in de dierproeven beschreven in dit project voorstel zullen gebruikt worden om

de veiligheid van humane respiratoire virussen voor gebruik in de mens te rapporteren aan de regelgevende instanties. Bij bewezen veiligheid kunnen deze humane respiratoire virussen ingezet worden voor het uittesten van interventie strategieën in de mens. Indien in de mens aangetoond kan worden dat de uit te testen interventie strategie effectief is, zullen de verkregen resultaten gebruikt worden in het registratie proces van die betreffende interventie strategie.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Het doel van deze projectaanvraag is het uitvoeren van vereiste veiligheidstesten van humane respiratoire virussen welke in het humane challenge model gebruikt kunnen worden.

Voor de verschillende virussen in de verschillende preklinische modellen zal op een kwantitatieve manier beoordeeld worden of de virus stock voor humaan gebruik veilig is. Hiertoe zal de voor die betreffende combinatie van virus en diermodel een primaire uitleesparameter gekozen worden (virologie of pathologie), welke gelijkwaardig of verminderd pathogeen moet zijn dan het oorspronkelijke virus of de meegenomen positieve controle.

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

In alle hier voorgelegde dierproeven zal bepaald worden of een nieuw opgegroeide virus stock vergelijkbaar of verminderd pathogeen is dan het oorspronkelijke virus. Deze bepaling zal op een kwantitatieve manier uitgevoerd worden en per dierproef (combinatie van diermodel en virus) zal bepaald worden wat de primaire uitleesparameter is. Indien van toepassing kan het zijn dat een positieve controle (oorspronkelijke virus of vergelijkbaar relevant virus) en/of een negatieve controle meegenomen wordt. Een dergelijke negatieve controle is om aan te tonen dat bij gelijke (be)handelingen geen effect wordt waargenomen, die toegeschreven kan worden aan de behandeling. Hierbij kan gedacht worden aan meer conventionele modellen, zoals de fret, waarbij bijvoorbeeld minimale macroscopische schade aan de longen inherent is aan het model en niet te wijten is aan de infectie met het virus. Indien mogelijk zullen resultaten van de positieve controle verkregen worden uit reeds uitgevoerde experimenten met het betreffende virus om tegemoet te komen aan vermindering van proefdiergebruik.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

De verschillende onderdelen dienen allemaal hetzelfde doel, namelijk onderzoek naar de veiligheid van een humaan respiratoir virus voor gebruik in mensen. Afhankelijk van de primaire uitleesparameter zal een keuze gemaakt worden tussen de verschillende modellen zoals beschreven in de verschillende modules, indien meerdere modellen beschikbaar zijn. Daarnaast is het wel zo dat als in het gekozen model verhoogde virulentie of pathogeniciteit geobserveerd wordt, het betreffende virus gediskwalificeerd wordt voor humaan gebruik.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Veiligheid van influenza virus voor humaan gebruik
2	Veiligheid van respiratoir syncytieel virus voor humaan gebruik
3	Veiligheid van rhinovirus voor humaan gebruik
4	
5	
6	
7	
8	

9	
10	

Format

Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Testen van de veiligheid van bovenste luchtweg virussen bestemd voor humaan gebruik in muizen, katoenratten en fretten.
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Muizen, fretten, katoenratten, virus, veiligheid

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project. <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	☒ Fundamenteel onderzoek
	☒ Translationeel of toegepast onderzoek
	☒ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
	☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	☐ Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	☐ Hoger onderwijs of opleiding
	☐ Forensisch onderzoek
	☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Bovenste luchtweginfecties door virussen zorgen jaarlijks voor een hoge ziektelast en dit leidt tot een hoge economische schade. Voor bijvoorbeeld de Verenigde Staten, een samenleving vergelijkbaar met West-Europa, is uitgerekend dat de economische schade voor niet-griep gerelateerde bovenste luchtweg infecties op kan lopen tot 40 miljard dollar. Hierin zijn (al dan niet effectieve en relevante) directe medische kosten meegenomen, maar ook indirecte kosten, zoals bijvoorbeeld het opnemen van vrije dagen door ouders met kinderen die een infectie doormaken. Daarbovenop kunnen bij de zogenaamde risicogroepen (baby's, jonge kinderen, bejaarden, chronisch zieken en patiënten met een verzwakt afweersysteem) ernstige complicatie optreden en zelfs sterfte voorkomen. Vanwege het feit dat deze bovenste luchtweginfecties een hoge ziektelast en een hoge economische schade veroorzaken, zoeken farmaceutische bedrijven naar vaccins/medicijnen om deze te verlagen. Tevens kunnen deze vaccins/medicijnen ook ingezet worden bij ernstigere ziektebeelden in risico
---	--

groepen.
Tot een aantal jaar geleden werden vaccins/medicijnen alleen uitgetest in proefdieren, echter in de afgelopen jaren is zeker voor relatief milde luchtweg infecties door virussen ook de mens zelf als studie object in opkomst. Het grote voordeel hiervan is de controleerbaarheid van de studie. Indien een grote klinische studie opgezet wordt, is het moeilijk om te voorspellen bij welk aantal deelnemers significantie bereikt wordt in de test resultaten tussen specifiek behandelde en placebo behandelde deelnemers. Daarnaast is het zo dat het soms onduidelijk is of de betreffende deelnemer een infectie heeft opgelopen omdat een actieve screening op virussen op alle deelnemers logistiek moeilijk is. Bij een humane challenge waarbij een vaccin of medicijn uitgetest wordt, kunnen de deelnemers uitvoerig gescreend worden en is van alle deelnemers bekend of ze geïnfecteerd zijn en dus of het middel gewerkt heeft.

Vanuit de regelgevende instanties wordt gesteld dat dergelijke virussen die gebruikt zullen worden in de mens, moeten worden getest op veiligheid. De experimenten omschreven in deze aanvraag hebben tot doel om deze veiligheid uit te testen.

3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	De resultaten verkregen in deze studie zullen bijdragen aan de kennis over de veiligheid van milde luchtweg virussen die gebruikt kunnen worden in de mens. Resultaten uit dit soort studies zullen gebruikt kunnen worden voor de vrijgifte van de uit te testen virussen.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Muizen: 1200 Fretten: 900 Katoenratten: 900
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	Door toediening van de verschillende preparaten kunnen de dieren last krijgen van luchtweg verschijnselen en in het geval van griepvirussen neurologische verschijnselen. De negatieve gevolgen zijn tot een minimum beperkt aangezien virussen voor gebruik in de mens ook in de mens slechts milde ziekte verschijnselen vertonen.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	In alle experimenten is het maximale ongerief ingeschat als licht.
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Overlevende dieren zullen na afloop van de studie gedood worden om in verschillende weefsels te bepalen hoeveel virus erin zit en of er schade aantoonbaar is.

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdier vrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

De studies welke uitgevoerd worden onder dit project zijn opgezet om de veiligheid van luchtweg virussen voor gebruik in de mens te bestuderen. Dergelijke studies zijn niet mogelijk zonder diermodellen met een intact afweersysteem. Er zal voorafgaand wel proefdier-vrij onderzoek uitgevoerd worden om te bestuderen of er aanwijzingen zijn dat het betreffende virus niet veilig is.

4.2 **Vermindering**

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Voor zover mogelijk zullen resultaten uit eerdere studies of gepubliceerde resultaten gebruikt worden voor een bepaling van de groepsgrootte. Daarnaast is het zo dat binnen de studies resultaten van verschillende dagen met elkaar vergeleken worden, waardoor het aantal dieren laag gehouden kan worden.

4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en).
Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

De keuze voor de verschillende diermodellen is bepaald vanuit de gevoeligheid voor een bepaald virus en de primaire uitleesparameter. Voor elke studie zal het kleinst mogelijke diermodel, dat beschikbaar is, gebruikt worden. Indien mogelijk zal een eerste bepaling uitgevoerd worden in het kleinst mogelijke diermodel, waarna kandidaat virussen uitgetest worden in een klinisch relevanter model.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

De dieren worden standaard gehuisvest in groepen met kooiverrijking en minimaal eenmaal per dag gecontroleerd. De meest ingrijpende handelingen zullen uitgevoerd worden onder verdoving. Als de dieren een bepaalde ziektebeeld gaan vertonen (luchtwegproblemen) of als verwacht wordt dat ze snel meer verschijnselen zullen gaan vertonen, zullen de dieren intensiever geobserveerd worden.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	90500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Veiligheid van influenza virus voor humaan gebruik

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Voor het onderzoek naar influenza virussen is het ook mogelijk om gebruik te maken van gezonde vrijwilligers in plaats van proefdieren. Om de veiligheid van deze vrijwilligers te waarborgen is het van belang dat de virussen waarmee ze worden geïnfecteerd van te voren worden getest op virulentie en pathogeniciteit. Bij de productie van een virus stock voor gebruik in de mens wordt het betreffende virus in vitro opgegroeid. Om te kunnen garanderen dat het virus dat de mens in gaat nog steeds hetzelfde fenotype heeft, zal deze eerst in dieren getest moeten worden. Dergelijke vereisten zijn in het algemeen omschreven in de Pharmacopeia, vertaald door Memoli et al (Clinical Infectious Diseases 2015, Appendix 1) en toegepast in de genoemde publicatie voor wat betreft het uittesten van influenza virus in muizen. Voor influenza zijn verschillende diermodellen beschikbaar, die al dan niet translationeel zijn naar de mens. Het kleinste mogelijke model is de muis en alhoewel het klinische beeld niet overeenkomt met dat van de mens en muizen verminderd vatbaar zijn voor niet muis-geadapteerde influenza stammen, kan dit model wel gebruikt worden om de virus replicatie te bestuderen in de longen. Dit model kan beschouwd worden als een eerste keuze model, waarna voor een meer klinisch relevant model gekozen kan worden voor een kandidaat virus voor humaan gebruik. Indien meerdere kandidaat virus stocks beschikbaar zijn kan in het muizenmodel een eerste selectie gemaakt worden op basis van virulentie. Virus stocks die meer virulentie vertonen dan de controle (het oorspronkelijke virus of de meegenomen relevante positieve controle), zullen uitgesloten worden voor humaan gebruik en dus niet verder getest worden in het frettenmodel (NO GO). Kandidaat virus stock(s) die verminderde of gelijke virulentie vertonen in vergelijking met de controle kan (kunnen) vervolgens uitgetest worden in het fretten model (GO). Dit frettenmodel is een meer relevant model, waarbij de aanhechting van het virus, het ziekteverloop en de uiteindelijke pathologie vergelijkbaar is met de mens. Resultaten verkregen in het frettenmodel zijn leidend voor de veiligheid in de mens en bij

verminderde of gelijke pathologie in vergelijking met de controle kan de betreffende virus stock vrijgegeven worden voor gebruik in de mens (GO). Bij verhoogde pathologie in vergelijking met de controle zal het betreffende virus alsnog gediskwalificeerd worden voor gebruik in de mens (NO GO).

Zoals hierboven genoemd is de primaire uitkomst parameter in deze experimenten afhankelijk van het gekozen diermodel. Deze is voor de verschillende modellen:

- Muizen: virus replicatie in de longen (virulentie)
- Fretten: long pathologie (pathogeniciteit)

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Muizen:

Nadat de dieren zijn aangekomen binnen de faciliteit zullen ze een acclimatisatie periode hebben van minimaal 1 week. Dieren worden voor de proef gewogen, geïdentificeerd door middel van oorknip en er wordt bloed afgenomen via de wangprik (~100ul) voor serum (het zogenaamde nul-monster). Deze hoeveelheid serum (~50ul) is voldoende om in het geval van onverwachte resultaten op basis van serologie uit te sluiten dat de dieren op voorhand een immunologische respons hadden die van invloed zou kunnen zijn op de infectie. Daarnaast zal dit nul-monster ook dienen als referentie in de serologische analyses. Nadat de dieren zijn gesedeerd (isofluraan 3-4%), worden de dieren intranasaal (50µL) geïnoculeerd. Op een aantal vroege tijdstippen na inoculatie wordt een aantal dieren van iedere groep geëuthanaseerd, waarna de longen worden verzameld. Deze vroege tijdstippen zijn gekozen om tijdens de log-fase van de virus replicatie te bestuderen of er verschillen zijn tussen de verschillende doseringen/virussen op basis van virulentie en pathologie. Het tijdstip van deze vroege momenten zal afhangen van het betreffende virus en zal bepaald worden op basis van reeds beschikbare data of via literatuur onderzoek. De overgebleven dieren worden aan het einde van het experiment (dag 14) geëuthanaseerd en ook hier worden de longen verzameld voor virologie en pathologie. Dit late tijdstip is gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. Het eerste (verlengde uitscheiding van het virus) zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus. Tijdens de gehele studie worden de dieren dagelijks gewogen en wordt er gekeken naar klinische verschijnselen. Daarnaast zullen dieren vroegtijdig uit de studie worden gehaald indien het humane eindpunt wordt bereikt. Hieronder is een voorbeeld van een dergelijke studie waarin een bepaald(e) influenza virus (dosis) getest wordt in muizen. Daarnaast zal in een dergelijke studie een negatieve en een positieve controle meegenomen worden. De positieve controle dient om de vergelijking te maken met het uit te testen virus en de negatieve controle als nul-referentie ten opzichte van de geïnfecteerde dieren. Voor beide controles zal het tijdstip van euthanasie beschreven en beargumenteerd worden in het werkprotocol.

		Infection phase																				
Group	No/Group	d -7																				
			d -1	d0		d1	d2	d3		d4	d5	d6	d7		d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14	
1	6	entry of animals in the preclinical facility	C,W, B	Intranasal Administration of influenza virus, C, W	C,W	C,W	C, B, W, Euthanasia, T															
2	6						C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T													
3	6						C, W	C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T												
4	6						C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T		
HOUSING		DM-II	DM-II																			

* W = body weight, B = blood for serum, C = clinical scoring, T = tissue;

Fretten:

Nadat de dieren zijn aangekomen binnen de faciliteit zullen ze een acclimatisatie periode hebben van minimaal 1 week. Minimaal 14 dagen voor de start van het experiment zal een zgn. nul-bloedmonster voor referentie in analyses afgenomen worden onder sedatie via de vena jugularis. Dit serum zal gebruikt worden om in het geval van onverwachte resultaten op basis van serologie

uit te sluiten dat de dieren op voorhand een immunologische respons hadden die van invloed zou kunnen zijn op de infectie. Daarnaast zal dit nul-monster ook dienen als referentie in de serologische analyses. Hierna zal een datalogger ingebracht worden. Dit zal gebeuren door middel van een operatie waarbij de buikwand geopend zal worden en de temperatuurlogger via de linea alba in de peritoneale holte geplaatst zal worden waarna de wond gehecht wordt. Deze datalogger meet de lichaamstemperatuur en/of activiteit van het dier gedurende de looptijd van de studie (klinische parameter). Peri- en postoperatief zullen de dieren topicale pijnbestrijding krijgen om het genezingsproces te bevorderen en na afloop van de operatie zal de werking van de anesthesie geantagoneerd worden. Op dag -1 zullen alle dieren gewogen en bemonsterd (neus en keel) worden en op dag 0 via de intranasale route geïnoculeerd worden met een volume van 300ul. Het nul-monster wordt een dag voor de daadwerkelijke inoculatie uitgevoerd om geen interferentie te hebben met de inoculatie zelf. Aangezien hier een uitspraak gedaan zal worden over de veiligheid in gebruik bij de mens, wordt ook de route identiek gehouden (ter vergelijking: een dergelijk challenge in mensen wordt ook via de intranasale route gegeven). Na infectie zal de anesthesie geantagoneerd worden en zullen de dieren dagelijks bemonsterd worden uit de bovenste luchtwegen (keel en neus) onder anesthesie en zal de Body Score Index bepaald worden. Bij makkelijk palpabele ribben zal besloten worden om vanuit welzijnsstandpunt de dieren te wegen tijdens hetzelfde anesthesie moment. Op gezette tijden na infectie (of eerder indien een dier het humane eindpunt bereikt) zullen dieren geëuthanaseerd worden voor het verzamelen van relevant weefsel. De overgebleven dieren worden aan het einde van het experiment (dag 14) geëuthanaseerd en ook hier worden de longen verzameld. Dit late tijdstip is gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. Het eerste (verlengde uitscheiding van het virus) zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus. Daarnaast zullen de dieren dagelijks tot het einde van de proef geobserveerd worden om te bepalen of er klinische verschijnselen te zien zijn. Hieronder is een voorbeeld van een dergelijke studie waarin twee (verschillende doses van een) influenza virus getest worden in fretten in vergelijking met negatieve en een positieve controle. De route van de negatieve danwel positieve controle kan afwijken van de route voor de uit te testen virus stock (bijvoorbeeld intratracheaal of zowel intratracheaal als intranasaal), dit zal op geleide van historische gegevens gaan en zal beargumenteerd worden in het werkprotocol.

		Preparation*		Challenge & Sampling**																				
Group	No/Group	d -21	d -14**	d -1	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14					
1	3	entry of animals into the preclinical facility	W	Implantation data logger, B*	C, S, W	C, S	C, S	Negative control												C, B, S, Euthanasia, T				
2	3							Virus (dose) 1	C, S	C, S	C, S	C	C, S	C	C	C, S	C	C	C, S	C	C	C	C	C, S, Euthanasia, T
3	3																							
4	3																							
5	3																							
6	3																							
7	3																							
8	3																							
9	3																							
10	3																							
HOUSING		DM-I/II		DM-II/isolator																				

Animals seronegative for circulating Influenza viruses and Aleutian Disease will be brought into the animal facility

* S = nose & throat swabs, B = blood for serum, C = clinical scoring, W = body weight, T = tissue;

** all animals will be implanted with a pre-programmed data logger

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

Muizen:

Aangezien het hier nieuwe influenza virussen betreffen welke nog niet uitgetest zijn in het muizen model is nog geen spreiding van de resultaten bekend op het gebied van virale load in de longen (primaire uitleesparameter in het muizenmodel). Er kan dus geen exacte statistische berekening

gedaan worden over de groepsgrootte. Als er gekeken wordt naar de publicatie van Overbaugh en Richardson (J. Virology 2005) is gekozen voor een groepsgrootte per euthanasie moment van 6 dieren, bij deze groepsgrootte zal een outlier binnen een groep geen invloed hebben op de significantie. Indien reeds data beschikbaar is van het betreffende wild-type virus, kan dit wel gebruikt worden voor een power berekening en zal dit in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD. Wel is al beschreven dat met deze aantallen dieren een significante uitspraak gedaan kan worden over de replicatie kinetiek van het opgegroeide virus voor humaan gebruik in vergelijking met het oorspronkelijke virus in muizen (Memoli et al Clinical Infectious Diseases 2015).

Fretten:

Aangezien het hier nieuwe influenza virussen betreffen welke nog niet uitgetest zijn in het fretten model is nog geen spreiding van de resultaten bekend op het gebied van de pathologie (primaire uitleesparameter in het frettenmodel). Er kan dus geen exacte statistische berekening gedaan worden over de groepsgrootte. Per euthanasie moment zullen drie dieren gebruikt worden. Aangezien in dit experiment de verschillende groepen met elkaar vergeleken kunnen worden, is het mogelijk om de experimenten met een dergelijk laag aantal dieren per groep uit te voeren. Eerdere vergelijkbare experimenten (dose-finding van influenza virussen in fretten) hebben laten zien dat met dergelijke kleine groepen een goed onderbouwde keuze gemaakt kan worden over de dosis van het betreffende virus. De verwachting is dat in deze experimenten dergelijke aantallen ook voldoende zijn om te komen tot een gedegen uitspraak in de resultaten. Indien reeds data beschikbaar is van het betreffende wild-type virus, kan dit wel gebruikt worden voor een power berekening en zal dit in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD.

B. De dieren

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

Diersoort:

- **muizen (stam nader te bepalen):** vrouwelijk of mannelijk van 6-8 weken oud.
Reeds gepubliceerd onderzoek zal basis zijn voor de keuze van de muizenstam, de leeftijd en het geslacht voor het betreffende virus. Indien deze voorkennis niet beschikbaar is, zal naar homologie gekeken worden voor de meest gevoelige muizenstam en het betreffende geslacht.
- **Fretten:** fretten, mannelijk of vrouwelijk van 4-8 maanden oud.
Fretten zijn gevoelig voor infectie met wild-type klinische relevante influenza virussen en derhalve worden fretten bijvoorbeeld ook regelmatig gebruikt voor het genereren van antisera voor het typeren van influenza virussen. Daarnaast zijn de klinische verschijnselen geobserveerd in fretten overeenkomstig met de klinische verschijnselen in mensen. Voor deze experimenten zullen vrouwelijke of mannelijke dieren gebruikt worden en de keus voor een bepaald geslacht zal bepaald worden door de beschikbaarheid van de verschillende geslachten. De beschikbaarheid van een gevalideerd model is minder van toepassing in deze dierproeven aangezien binnen deze experimenten de verschillende groepen 1:1 vergeleken worden met elkaar. Daarnaast zijn de groepen dusdanig klein in deze experimenten, dat met dergelijke aantallen niet gewerkt kan worden met gemixte groepen van mannelijke en vrouwelijke dieren. Het gebruik van gemixte groepen zal altijd gepaard gaan met grotere aantallen en is niet wenselijk in het kader van vermindering.

Herkomst: geregistreerde proefdierfokker

- Fretten: Er is een jarenlange relatie met de betreffende fokker en in overleg met de aanvrager is een huisvestingsregime opgesteld dat de influenza-specifieke seronegativiteit van de dieren waarborgt. Dit laatste garandeert dat de dieren ook daadwerkelijk geïnfecteerd kunnen worden.

Geschatte aantal:

- Muizen: 1200 dieren in 5 jaar. Er wordt verwacht om een dergelijke studie 4 keer per jaar uit te voeren voor een bepaald virus in twee verschillende doseringen met per dosering vier verschillende euthanasie momenten t.o.v. een positieve en een negatieve controle die beide een enkel euthanasie moment hebben, dus een totaal aantal van 4 studies x 10 groepen van 6 dieren x 5 jaar = 1200 dieren
- Fretten: 600 dieren in 5 jaar. Er wordt verwacht om een dergelijke studie 4 keer per jaar

uit te voeren voor een bepaald virus in twee verschillende doseringen met per dosering vier verschillende euthanasie momenten t.o.v. een positieve en een negatieve controle die beide een enkel euthanasie moment hebben, dus een totaal aantal van 4 studies x 10 groepen van 3 dieren x 5 jaar = 600 dieren

Bij de berekening van de aantallen is rekening gehouden met het feit dat elk jaar 4 verschillende influenza virussen circuleren (2xA en 2xB) en deze vertegenwoordigd zijn in het vaccin. Effectiviteit dient dus uitgetest te worden tegen alle vier de circulerende virussen, vandaar dat een dergelijke studie 4 keer per jaar wordt uitgevoerd.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☐ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: deze experimenten zijn opgezet om te bepalen of de virus stock die geproduceerd is voor gebruik in de mens vergelijkbaar of minder pathogeen is dan het oorspronkelijke virus. Eerste resultaten zullen verkregen worden in vitro, waarbij bestudeerd wordt of het virus een andere groei kinetiek vertoont. Bij verhoogde groei kinetiek kan besloten worden om het in vivo experiment niet uit te voeren (GO/NO GO beslissing). Voor het bepalen van de pathogeniciteit en replicatie in de luchtwegen is het intacte dier benodigd en daarom is dit in vitro niet na te bootsen.

Vermindering: voorafgaand aan het in vivo experiment, zal het virus in vitro bestudeerd worden om te bepalen of de kinetiek van de virus stock afwijkt van het oorspronkelijke virus. Indien een verhoogde replicatie/pathogeniciteit (in vitro) geobserveerd wordt, kan besloten worden om de betreffende stock niet uit te testen in vivo. Bovengenoemde groepsgrootte is bepaald op basis van verwachtingen, echter indien al in vivo resultaten beschikbaar zijn voor het betreffende virus zal dit gebruikt worden voor een nieuwe power berekening. Deze zal in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD.

Verfijning: Meest invasieve behandelingen zullen uitgevoerd worden onder sedatie en dieren worden dagelijks geobserveerd. Indien de klinische symptomen daartoe aanleiding geven (vertonen van ademhalingsproblemen) zullen de dieren frequenter geobserveerd worden. Zo kan voorkomen worden dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment. Als er meerdere kandidaat influenza virussen zijn, zullen deze in eerste instantie het muizenmodel bestudeerd worden. Op basis van de resultaten in deze studies kan besloten worden om bepaalde influenza virussen wel (GO) of niet (NO GO) uit te testen in het frettenmodel. In het algemeen zullen alleen laag-pathogene virussen gebruikt worden in het humane challenge model, dit zal dus ook in het frettenmodel tot zeer beperkt ongerief leiden en aangezien deze virussen niet muis-geadapteerd zijn, zal het veroorzaakte ongerief ook beperkt zijn in het muizenmodel. Echter, tijdens de challenge fase kunnen klinische symptomen zeer snel tot uiting komen omdat de replicatie van influenza een logaritmische curve doormaakt. Zo kan bijvoorbeeld aan het eind van de dag besloten worden om laat op de avond nog een extra controle tijdstip in te voegen vanwege dierwelzijnsstandpunt om te voorkomen dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt worden door het feit dat de dieren gehuisvest zullen worden na infectie onder klasse II of klasse III inperking. Afval (bedding, kadavers en andere gebruikte materialen) zal aangeboden worden voor destructie.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Na de operatieve plaatsing van de temperatuur loggers bij fretten zullen de dieren peri- en post operatief pijnbestrijding krijgen (meloxicam). Als gevolg van de infectie en vervolgens replicatie van het virus in de luchtwegen, is de inschatting dat de dieren geen pijn zullen ondervinden.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Andere verschijnselen die de dieren kunnen vertonen, maar die niet gepaard gaan met pijn zijn:

- zijn algemene verschijnselen: gewichtsverlies en verminderd actief bij stimulatie
- respiratoire verschijnselen: een verhoogde ademhalingsfrequentie (deze zal bij verergering overgaan in stokkende/schokkende ademhaling)
- neurologische verschijnselen: verstoorde locomotie zoals een instabiele gang en/of ongecontroleerde bewegingen (deze zal bij verergering overgaan in verlamming (parese en paralyse)).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De klachten worden veroorzaakt door infectie met het influenza virus en vervolgens replicatie in de luchtwegen (respiratoire verschijnselen) of de hersenen (neurologische verschijnselen).

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

Behalve na implantatie van de temperatuur loggers in fretten, is de inschatting is dat de dieren binnen de studie geen pijn zullen ondervinden als gevolg van de infectie (zie ook H). Daarnaast is het zo dat de meest gangbare analgetica in het algemeen naast pijnstillende ook een ontstekingsremmende werking hebben en kunnen dus interfereren in de studie. Daarom is per definitie het gebruik van dergelijke analgetica niet mogelijk in deze experimenten vanwege verstoring van de primaire uitlees parameter.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Muizen:

De dieren zullen dagelijks geobserveerd worden en klinische scores worden genoteerd. Bij matig ongerief (zie hieronder de inschaling van de ongerief klassen) zal het betreffende dier uit de studie worden genomen. Deze klinische ongerief klassificaties zijn:

Licht: 2 algemene symptomen*

Matig: 3 algemene symptomen*

Ernstig: gewichtsverlies van >15% ten opzichte van gewicht bij aanvang van de proef

* algemene symptomen: opgezette vacht, gebogen postuur en verminderd actief

Fretten:

Tijdens de challenge fase kunnen infectie gerelateerde verschijnselen optreden welke leiden tot de volgende humane eindpunten. Bij het vertonen 1 van de volgende humane eindpunten (matig ongerief) zal het betreffende dier geëuthanaseerd worden:

1. Gewichtsverlies: na infectie worden de dieren dagelijks bemonsterd, waarbij ook de Body Score Index bepaald kan worden. Indien de dieren een voelbare vermagering hebben (ribben makkelijk palpabel), zullen ze vanuit welzijnsstandpunt dagelijks gewogen worden. Het humane eindpunt is gedefinieerd als het betreffende dier >10% gewicht verliest (geclassificeerd als matig ongerief) t.o.v. het startgewicht op de dag van challenge.
2. Respiratie: bij verergering van de ziekte zal de ademhaling veranderen van normale naar een verhoogde ademhalingsfrequentie (licht ongerief). Bij verergering van de symptomen naar stokkende / schokkende ademhaling zal het dier geëuthanaseerd worden (matig ongerief).
3. Diarree: indien in de huisvesting te zien is dat een of meerdere dieren diarree (geclassificeerd als matig) hebben, zullen alle dieren afzonderlijk beoordeeld worden om te bepalen of er aanwijzingen zijn (vuile vacht rond de anus) welke dieren daadwerkelijk diarree vertonen.

Muizen/Fretten:

Bij de volgende verschijnselen zullen de dieren direct geëuthanaseerd worden (beide geclassificeerd als ernstig ongerief):

1. Neurologisch: in enkele gevallen kan het virus vanuit de neus van het dier doorslaan naar de hersenen en zo een ontsteking van de hersenen induceren. De daarbij behorende verschijnselen zijn onstabiele gang en ongecontroleerde bewegingen (zoals beschreven in Bodewes et al 2015 AJP).
2. Lethargie: indien een dier lethargisch is (m.a.w. als het niet meer reageert op externe prikkels).

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

100% van de dieren zullen licht ongerief vertonen als gevolg van de infectie met influenza virus. De verwachting is dat meer dan licht ongerief niet zal voorkomen (<5%) aangezien in het algemeen influenza virussen welke bedoeld zijn voor humane challenge alleen milde verschijnselen zullen vertonen en daarnaast zijn dit geen virussen welke geadapteerd zijn aan de muis, die na muis-adaptie meer pathogeen zijn dan het wild-type virus.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Het cumulatieve ongerief voor deze experimenten wordt ingeschaald op licht.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Om te controleren of het virus repliceert in de longen en wat de pathologische schade is in de longen, worden deze verwijderd en verder verwerkt voor onderzoek. Dit is niet mogelijk bij in leven laten van het dier.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja

Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	90500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	2	Veiligheid van respiratoir syncytieel virus voor humaan gebruik

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Voor het onderzoek naar respiratoir syncytieel virus (RSV) is het ook mogelijk om gebruik te maken van gezonde vrijwilligers in plaats van proefdieren. Om de veiligheid van deze vrijwilligers te waarborgen is het van belang dat de virussen waarmee ze worden geïnfecteerd van tevoren worden getest op virulentie en pathogeniciteit. Bij de productie van een virus stock voor gebruik in de mens wordt het betreffende virus in vitro opgegroeid. Om te kunnen garanderen dat het virus dat de mens in gaat nog steeds het zelfde fenotype heeft, zal deze eerst in dieren getest moeten. Dergelijke vereisten zijn in het algemeen omschreven in de Pharmacopeia, vertaald door Memoli et al (Clinical Infectious Diseases 2015, Appendix 1) en toegepast in de genoemde publicatie voor wat betreft het uittesten van influenza virus in muizen. Dergelijke studies voor het uittesten van RSV zijn nog niet eerder beschreven in de literatuur en derhalve zijn de studies zoals beschreven in dierproef 1 als richtlijn gebruikt voor het uittesten van RSV in de relevante diermodellen. Voor RSV zijn verschillende diermodellen beschikbaar. Het kleinst mogelijke model is de katoenrat en dit model kan goed gebruikt worden om de virus replicatie te bestuderen in de longen. Dit model kan beschouwd worden als een eerste keuze model, waarna voor een meer klinisch relevant model gekozen kan worden voor een kandidaat virus voor humaan gebruik. Indien meerdere kandidaat virus stocks beschikbaar zijn kan in het katoenrattenmodel een eerste selectie gemaakt worden op basis van virulentie. Virus stocks die meer virulentie vertonen dan de controle (het oorspronkelijke virus of de meegenomen relevante positieve controle), zullen uitgesloten worden voor humaan gebruik en dus niet verder getest worden in het frettenmodel (NO GO). Kandidaat virus stock(s) die verminderde of gelijke virulentie vertonen in vergelijking met de controle kan (kunnen) vervolgens uitgetest worden in het fretten model (GO). Dit frettenmodel is een meer relevant model, waarbij het ziekteverloop en de uiteindelijke pathologie vergelijkbaar is met de mens. Resultaten verkregen

in het frettenmodel zijn leidend voor de veiligheid in de mens en bij verminderde of gelijke pathologie in vergelijking met de controle kan de betreffende virus stock vrijgegeven worden voor gebruik in de mens (GO). Bij verhoogde pathologie in vergelijking met de controle zal het betreffende virus alsnog gediskwalificeerd worden voor gebruik in de mens (NO GO).

Zoals hierboven genoemd is de primaire uitkomst parameter in deze experimenten afhankelijk van het gekozen diermodel. Deze is voor de verschillende modellen:

- Katoenratten: virus replicatie in de longen (virulentie)
- Fretten: long pathologie (pathogeniciteit)

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Katoenratten:

Nadat de dieren zijn aangekomen binnen de faciliteit zullen ze een acclimatisatie periode hebben van minimaal 1 week. Dieren worden voor de proef gewogen, geïdentificeerd door middel van oorknip en er wordt bloed afgenomen via de wangprik (~100ul) voor serum (het zogenaamde nul-monster). Deze hoeveelheid serum (~50ul) is voldoende om in het geval van onverwachte resultaten op basis van serologie uit te sluiten dat de dieren op voorhand een immunologische respons hadden die van invloed zou kunnen zijn op de infectie. Daarnaast zal dit nul-monster ook dienen als referentie in de serologische analyses. Nadat de dieren zijn gesedeerd (isofluraan 3-4%), worden de dieren intranasaal (50µL) geïnoculeerd. Op een aantal vroege tijdstippen na inoculatie worden een aantal dieren van iedere groep geëuthanaseerd, waarna de longen worden verzameld. Deze vroege tijdstippen zijn gekozen om tijdens de log-fase van de virus replicatie te bestuderen of er verschillen zijn tussen de verschillende doseringen/virussen op basis van virulentie en pathologie. Het tijdstip van dit vroege moment zal afhangen van het betreffende virus en zal bepaald worden op basis van reeds beschikbare data of via literatuur onderzoek. De overgebleven dieren worden aan het einde van het experiment (dag 14) geëuthanaseerd en ook hier worden de longen verzameld voor virologie en pathologie. Dit late tijdstip is gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. Het eerste (verlengde uitscheiding van het virus) zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus. Tijdens de gehele studie worden de dieren dagelijks gewogen en wordt er gekeken naar klinische verschijnselen. Daarnaast zullen dieren vroegtijdig uit de studie worden gehaald indien het humane eindpunt wordt bereikt. Hieronder is een voorbeeld van een dergelijke studie waarin een bepaald(e) RSV dosis (doses) getest wordt in katoenratten. Daarnaast zal in een dergelijke studie een negatieve en een positieve controle meegenomen worden. De positieve controle dient om de vergelijking te maken met het uit te testen virus en de negatieve controle als nul-referentie ten opzichte van de geïnfecteerde dieren. Voor beide controles zal het tijdstip van euthanasie beschreven en beargumenteerd worden in het werkprotocol.

		Infection phase																
Group	No/Group	d -7																
			d -1	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14
1	6	entry of animals in the preclinical facility	C,W, B	Intranasal Administration of RSV, C, W	C,W	C,W	C, B, W, Euthanasia, T											
2	6						C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T									
3	6						C, W	C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T								
4	6						C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T	
HOUSING		DM-II	DM-II															

* W = body weight, B = blood for serum, C = clinical scoring, T = tissue;

* W = body weight, B = blood for serum, C = clinical scoring, T = tissue;

Fretten:

Nadat de dieren zijn aangekomen binnen de faciliteit zullen ze een acclimatisatie periode hebben van minimaal 1 week. Minimaal 14 dagen voor de start van het experiment zal een zgn. nul-bloedmonster voor referentie in analyses afgenomen worden onder sedatie via de vena jugularis. Dit serum zal gebruikt worden om in het geval van onverwachte resultaten op basis van serologie

uit te sluiten dat de dieren op voorhand een immunologische respons hadden die van invloed zou kunnen zijn op de infectie. Daarnaast zal dit nul-monster ook dienen als referentie in de serologische analyses. Hierna zal een datalogger ingebracht worden. Dit zal gebeuren door middel van een operatie waarbij de buikwand geopend zal worden en de temperatuurlogger via de linea alba in de peritoneale holte geplaatst zal worden waarna de wond gehecht wordt. Deze datalogger meet de lichaamstemperatuur en/of activiteit van het dier gedurende de looptijd van de studie (klinische parameter). Peri- en postoperatief zullen de dieren topicale pijnbestrijding krijgen om het genezingsproces te bevorderen en na afloop van de operatie zal de werking van de anesthesie geantagoneerd worden. Op dag -1 zullen alle dieren gewogen en bemonsterd (neus en keel) worden en op dag 0 via de intranasale route geïnoculeerd worden met een volume van 300ul. Het nul-monster wordt een dag voor de daadwerkelijke inoculatie uitgevoerd om geen interferentie te hebben met de inoculatie zelf. Aangezien hier een uitspraak gedaan zal worden over de veiligheid in gebruik bij de mens, wordt ook de route identiek gehouden (ter vergelijking: een dergelijk challenge in mensen wordt ook via de intranasale route gegeven). Na infectie zal de anesthesie geantagoneerd worden en zullen de dieren dagelijks bemonsterd worden uit de bovenste luchtwegen (keel en neus) onder anesthesie en zal de Body Score Index bepaald worden. Bij makkelijk palpabele ribben zal besloten worden om vanuit welzijnsstandpunt de dieren te wegen tijdens hetzelfde anesthesie moment. Op gezette tijden na infectie (of eerder indien een dier het humane eindpunt bereikt) zullen dieren geëuthanaseerd worden voor het verzamelen van relevant weefsel. De overgebleven dieren worden aan het einde van het experiment (dag 14) geëuthanaseerd en ook hier worden de longen verzameld. Dit late tijdstip is gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. Het eerste (verlengde uitscheiding van het virus) zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus. Daarnaast zullen de dieren dagelijks tot het einde van de proef geobserveerd worden om te bepalen of er klinische verschijnselen te zien zijn. Hieronder is een voorbeeld van een dergelijke studie waarin twee verschillende (doses van) RSV getest wordt in fretten in vergelijking met een positieve en een negatieve controle. De route van de negatieve dan wel positieve controle kan afwijken van de route voor de uit te testen virus stock (bijvoorbeeld intratracheaal of zowel intratracheaal als intranasaal), dit zal op geleide van historische gegevens gaan en zal beargumenteerd worden in het werkprotocol.

		Preparation*		Challenge & Sampling**																	
Group	No/Group	d -21	d -14**	d -1	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14		
1	3	entry of animals into the preclinical facility	W	Implantation data logger, B*	C, S, W	C, S	C, S	Negative control	C, S	C, S	C, S	C	C, S	C	C	C, S	C	C	C, B, S, Euthanasia, T		
2	3							Virus (dose) 1	C, S, Euthanasia, T												
3	3								C, S	C, S	C, S, Euthanasia, T										
4	3								C, S	C, S	C, S	C	C, B, S, Euthanasia, T								
5	3								C, S	C, S	C, S	C	C, S	C	C	C, S	C	C	C	C, B, S, Euthanasia, T	
6	3								C, S, Euthanasia, T												
7	3								Virus (dose) 2	C, S	C, S	C, S, Euthanasia, T									
8	3									C, S	C, S	C, S	C	C, B, S, Euthanasia, T							
9	3									C, S	C, S	C, S	C	C, S	C	C	C, S	C	C	C	C, B, S, Euthanasia, T
10	3							Positive control	C, S	C, S	C, S, Euthanasia, T										
HOUSING		DM-I/II		DM-II/isolator																	

Animals seronegative for RSV and Aleutian Disease will be brought into the animal facility
* S = nose & throat swabs, B = blood for serum, C = clinical scoring, W = body weight, T = tissue;
** all animals will be implanted with a pre-programmed data logger

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

Katoenratten:

Aangezien het hier nieuwe RSV isolaten betreffen welke nog niet uitgetest zijn in het katoenratten model is nog geen spreiding van de resultaten bekend op het gebied van virale load in de longen (primaire uitleesparameter in het katoenrattenmodel). Er kan dus geen exacte statistische

berekening gedaan worden over de groepsgrootte. Als er gekeken wordt naar de publicatie van Overbaugh en Richardson (J. Virology 2005) is gekozen voor een groepsgrootte per euthanasie moment van 6 dieren, bij deze groepsgrootte zal een outlier binnen een groep geen invloed hebben op de significantie. Indien reeds data beschikbaar is van het betreffende wild-type virus, kan dit wel gebruikt worden voor een power berekening en zal dit in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD. Naar analogie met influenza in muizen is wel al beschreven dat met deze aantallen dieren een significante uitspraak gedaan kan worden over de replicatie kinetiek van het opgegroeide virus voor humaan gebruik in vergelijking met het oorspronkelijke virus in muizen (Memoli et al Clinical Infectious Diseases 2015).

Fretten:

Aangezien het hier nieuwe RSV isolaten betreffen welke nog niet uitgetest zijn in het fretten model is nog geen spreiding van de resultaten bekend op het gebied van de pathologie (primaire uitleesparameter in het frettenmodel). Er kan dus geen exacte statistische berekening gedaan worden over de groepsgrootte. Per euthanasie moment zullen drie dieren gebruikt worden. Aangezien in dit experiment de verschillende groepen met elkaar vergeleken kunnen worden, is het mogelijk om de experimenten met een dergelijk laag aantal dieren per groep uit te voeren. Eerdere vergelijkbare experimenten (dose-finding van influenza virussen in fretten) hebben laten zien dat met dergelijke kleine groepen een goed onderbouwde keuze gemaakt kan worden over de dosis van het betreffende virus. De verwachting is dat in deze experimenten dergelijke aantallen ook voldoende zijn om te komen tot een gedegen uitspraak in de resultaten. Indien reeds data beschikbaar is van het betreffende wild-type virus, kan dit wel gebruikt worden voor een power berekening en zal dit in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD.

B. De dieren

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

Diersoort:

- **Katoenratten:** vrouwelijk of mannelijk van 6-8 weken oud.
Reeds gepubliceerd en eerder door de aanvragen uitgevoerd onderzoek heeft aangetoond dat katoenratten gevoelig zijn voor infectie met RSV. De keus van mannelijke of vrouwelijke dieren zal gemaakt worden op basis van de beschikbaarheid. Gemengde groepen zijn voor dit model niet mogelijk i.v.m. agressie.
- **Fretten:** fretten, mannelijk of vrouwelijk van 4-8 maanden oud.
Fretten zijn gevoelig voor infectie met wild-type RSV isolaten (eigen uitgevoerd onderzoek). De klinische verschijnselen geobserveerd in fretten zijn overeenkomstig met de klinische verschijnselen in mensen. Voor deze experimenten zullen vrouwelijke of mannelijke dieren gebruikt worden en de keus voor een bepaald geslacht zal bepaald worden door de beschikbaarheid van de verschillende geslachten. De beschikbaarheid van een gevalideerd model is minder van toepassing in deze dierproeven aangezien binnen deze experimenten de verschillende groepen 1:1 vergeleken worden met elkaar. Daarnaast zijn de groepen dusdanig klein in deze experimenten, dat met dergelijke aantallen niet gewerkt kan worden met gemixte groepen van mannelijke en vrouwelijke dieren. Het gebruik van gemixte groepen zal altijd gepaard gaan met grotere aantallen en is niet wenselijk in het kader van vermindering.

Herkomst: geregistreerde proefdierfokker

- Fretten: Er is een jarenlange relatie met de betreffende fokker en in overleg met de aanvrager is een huisvestingsregime opgesteld dat de influenza-specifieke seronegativiteit van de dieren waarborgt. Dit laatste garandeert dat de dieren ook daadwerkelijk geïnfecteerd kunnen worden.

Geschatte aantal:

- Katoenratten: 600 dieren in 5 jaar. Er wordt verwacht om een dergelijke studie 2 keer per jaar uit te voeren voor een bepaald virus in twee verschillende doseringen met per dosering vier verschillende euthanasie momenten t.o.v. een positieve en een negatieve controle die beide een enkel euthanasie moment hebben, dus een totaal aantal van 2 studies x 10 groepen van 6 dieren x 5 jaar = 600 dieren
- Fretten: 300 dieren in 5 jaar. Er wordt verwacht om een dergelijke studie 2 keer per jaar

uit te voeren voor een bepaald virus in twee verschillende doseringen met per dosering vier verschillende euthanasie momenten t.o.v. een positieve en een negatieve controle die beide een enkel euthanasie moment hebben, dus een totaal aantal van 2 studies x 10 groepen van 3 dieren x 5 jaar = 300 dieren

Bij de berekening van de aantallen is rekening gehouden met het feit dat elk jaar 2 verschillende RSV virussen circuleren (1xA en 1xB). Effectiviteit dient dus uitgetest te worden tegen allebei de circulerende virussen, vandaar dat een dergelijke studie 2 keer per jaar wordt uitgevoerd.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☐ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: deze experimenten zijn opgezet om te bepalen of de virus stock die geproduceerd is voor gebruik in de mens vergelijkbaar of minder pathogeen is dan het oorspronkelijke virus. Eerste resultaten zullen verkregen worden in vitro, waarbij bestudeerd wordt of het virus een andere groei kinetiek vertoont. Bij verhoogde groei kinetiek kan besloten worden om het in vivo experiment niet uit te voeren (GO/NO GO beslissing). Voor het bepalen van de pathogeniciteit en replicatie in de luchtwegen is het intacte dier benodigd en daarom is dit in vitro niet na te bootsen.

Vermindering: voorafgaand aan het in vivo experiment, zal het virus in vitro bestudeerd worden om te bepalen of de kinetiek van de virus stock afwijkt van het oorspronkelijke virus. Indien een verhoogde replicatie/pathogeniciteit (in vitro) geobserveerd wordt, kan besloten worden om de betreffende stock niet uit te testen in vivo. Bovengenoemde groepsgrootte is bepaald op basis van verwachtingen, echter indien al in vivo resultaten beschikbaar zijn voor het betreffende virus zal dit gebruikt worden voor een nieuwe power berekening. Deze zal in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD.

Verfijning: Meest invasieve behandelingen zullen uitgevoerd worden onder sedatie en dieren worden dagelijks geobserveerd. Indien de klinische symptomen daartoe aanleiding geven (vertonen van ademhalingsproblemen) zullen de dieren frequenter geobserveerd worden. Zo kan voorkomen worden dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment. Als er meerdere kandidaat RSV virussen zijn, zullen deze in eerste instantie het katoenrattenmodel bestudeerd worden. Op basis van de resultaten in deze studies kan besloten worden om bepaalde RSV virussen wel (GO) of niet (NO GO) uit te testen in het frettenmodel. In het algemeen is RSV een laag-pathogeen virus, daarom zal het veroorzaakte ongerief ook beperkt zijn in beide modellen. Echter, tijdens de challenge fase kunnen klinische symptomen zeer snel tot uiting komen omdat de replicatie van RSV een logaritmische curve doormaakt. Zo kan bijvoorbeeld aan het eind van de dag besloten worden om laat op de avond nog een extra controle tijdstip in te voegen vanwege dierwelzijnsstandpunt om te voorkomen dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt

worden door het feit dat de dieren gehuisvest zullen worden na infectie onder klasse II of klasse III inperking. Afval (bedding, kadavers en andere gebruikte materialen) zal aangeboden worden voor destructie.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Na de operatieve plaatsing van de temperatuur loggers bij fretten zullen de dieren peri- en post operatief pijnbestrijding krijgen (meloxicam). Als gevolg van de infectie en vervolgens replicatie van het virus in de luchtwegen, is de inschatting dat de dieren geen pijn zullen ondervinden.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Andere verschijnselen die de dieren kunnen vertonen, maar die niet gepaard gaan met pijn zijn:

- zijn algemene verschijnselen: gewichtsverlies en verminderd actief bij stimulatie

- respiratoire verschijnselen: een verhoogde ademhalingsfrequentie (deze zal bij verergering overgaan in stokkende/schokkende ademhaling)

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De klachten worden veroorzaakt door infectie met RSV en vervolgens replicatie in de luchtwegen (respiratoire verschijnselen).

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

Behalve na implantatie van de temperatuur loggers in fretten, is de inschatting is dat de dieren binnen de studie geen pijn zullen ondervinden als gevolg van de infectie (zie ook H). Daarnaast is het zo dat de meest gangbare analgetica in het algemeen naast pijnstillende ook een ontstekingsremmende werking hebben en kunnen dus interfereren in de studie. Daarom is per definitie het gebruik van dergelijke analgetica niet mogelijk in deze experimenten vanwege verstoring van de primaire uitlees parameter.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Katoenratten:

De dieren zullen dagelijks geobserveerd worden en klinische scores worden genoteerd. Bij matig ongerief (zie hieronder de inschaling van de ongerief klassen) zal het betreffende dier uit de studie worden genomen. Deze klinische ongerief klassificaties zijn:

Licht: 2 algemene symptomen*

Matig: 3 algemene symptomen*

Eerstig: gewichtsverlies van >15% ten opzichte van gewicht bij aanvang van de proef.

* algemene symptomen: opgezette vacht, gebogen postuur en verminderd actief

Fretten:

Tijdens de challenge fase kunnen infectie gerelateerde verschijnselen optreden welke leiden tot de volgende humane eindpunten. Bij het vertonen 1 van de volgende humane eindpunten (matig ongerief) zal het betreffende dier geëuthanaseerd worden:

1. Gewichtsverlies: na infectie worden de dieren dagelijks bemonsterd, waarbij ook de Body Score Index bepaald kan worden. Indien de dieren een voelbare vermagering hebben (ribben makkelijk palpabel), zullen ze vanuit welzijnsstandpunt dagelijks gewogen worden. Het humane eindpunt is gedefinieerd als het betreffende dier >10% gewicht verliest (geclassificeerd als matig ongerief) t.o.v. het startgewicht op de dag van challenge.
2. Respiratie: bij verergering van de ziekte zal de ademhaling veranderen van normale naar een verhoogde ademhalingsfrequentie (licht ongerief). Bij verergering van de symptomen naar stokkende / schokkende ademhaling zal het dier geëuthanaseerd worden (matig ongerief).

Katoenratten/Fretten:

Bij de volgende verschijnselen zullen de dieren direct geëuthanaseerd worden (geclassificeerd als ernstig ongerief):

1. Lethargie: indien een dier lethargisch is (m.a.w. als het niet meer reageert op externe prikkels).

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

100% van de dieren zullen licht ongerief vertonen als gevolg van de infectie met RSV. De verwachting is dat meer dan licht ongerief niet zal voorkomen (<5%) aangezien in het algemeen RSV alleen milde infectie zal induceren in katoenratten en fretten.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Het cumulatieve ongerief voor deze experimenten wordt ingeschaald op licht.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Om te controleren of het virus repliceert in de longen en wat de pathologische schade is in de longen, worden deze verwijderd en verder verwerkt voor onderzoek. Dit is niet mogelijk bij in leven laten van het dier.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja

Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	90500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer 3	Type dierproef Veiligheid van rhinovirus voor humaan gebruik

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Voor het onderzoek naar rhinovirus is het ook mogelijk om gebruik te maken van gezonde vrijwilligers in plaats van proefdieren. Om de veiligheid van deze vrijwilligers te waarborgen is het van belang dat het virus waarmee ze worden geïnfecteerd van te voren worden getest op virulentie en pathogeniciteit. Bij de productie van een virus stock voor gebruik in de mens wordt het betreffende virus in vitro opgegroeid. Om te kunnen garanderen dat het virus dat de mens in gaat nog steeds het zelfde fenotype heeft, zal deze eerst in dieren getest moeten. Dergelijke vereisten zijn in het algemeen omschreven in de Pharmacopeia, vertaald door Memoli et al (Clinical Infectious Diseases 2015, Appendix 1) en toegepast in de genoemde publicatie voor wat betreft het uittesten van influenza virus in muizen. Dergelijke studies voor het uittesten van rhinovirus zijn nog niet eerder beschreven in de literatuur en derhalve zijn de studies zoals beschreven in dierproef 1 als richtlijn gebruikt voor het uittesten van rhinovirus in het relevante diermodel. Voor rhinovirus is vooralsnog maar één diermodel beschikbaar, namelijk de katoenrat. Dit model kan goed gebruikt worden om de virus replicatie te bestuderen in de longen. Virus stocks die meer virulentie vertonen dan de controle (het oorspronkelijke virus of de meegenomen relevante positieve controle), zullen uitgesloten worden voor humaan gebruik (NO GO). Virus stock(s) die verminderde of gelijke virulentie vertonen in vergelijking met de controle kunnen vrijgegeven worden voor gebruik in de mens (GO).

De primaire uitkomst parameter in deze experimenten is: virus replicatie in de longen (virulentie).

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Katoenratten:

Nadat de dieren zijn aangekomen binnen de faciliteit zullen ze een acclimatisatie periode hebben

van minimaal 1 week. Dieren worden voor de proef gewogen, geïdentificeerd door middel van oorknip en er wordt bloed afgenomen via de wangprik (~100ul) voor serum (het zogenaamde nul-monster). Deze hoeveelheid serum (~50ul) is voldoende om in het geval van onverwachte resultaten op basis van serologie uit te sluiten dat de dieren op voorhand een immunologische respons hadden die van invloed zou kunnen zijn op de infectie. Daarnaast zal dit nul-monster ook dienen als referentie in de serologische analyses. Nadat de dieren zijn gesedeerd (isofluraan 3-4%), worden de dieren intranasaal (50µL) geïnoculeerd. Op een aantal vroege tijdstippen na inoculatie worden een aantal dieren van iedere groep geëuthanaseerd, waarna de longen worden verzameld. Deze vroege tijdstippen zijn gekozen om tijdens de log-fase van de virus replicatie te bestuderen of er verschillen zijn tussen de verschillende doseringen/virussen op basis van virulentie en pathologie. De overgebleven dieren worden aan het einde van het experiment (dag 14) geëuthanaseerd en ook hier worden de longen verzameld voor virologie en pathologie. Dit late tijdstip is gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. Het eerste (verlengde uitscheiding van het virus) zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus. Tijdens de gehele studie worden de dieren dagelijks gewogen en wordt er gekeken naar klinische verschijnselen. Daarnaast zullen dieren vroegtijdig uit de studie worden gehaald indien het humane eindpunt wordt bereikt. Hieronder is een voorbeeld van een dergelijke studie waarin een bepaald(e) rhinovirus dosis (doses) getest wordt in katoenratten. Daarnaast zal in een dergelijke studie een negatieve en een positieve controle meegenomen worden. De positieve controle dient om de vergelijking te maken met het uit te testen virus en de negatieve controle als nul-referentie ten opzichte van de geïnfecteerde dieren. Voor beide controles zal het tijdstip van euthanasie beschreven en beargumenteerd worden in het werkprotocol.

		Infection phase																
Group	No/Group	d -7																
			d -1	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14
1	6	entry of animals in the preclinical facility	C,W, B	Intranasal Administration of RSV, C, W	C,W	C,W	C, B, W, Euthanasia, T											
2	6						C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T									
3	6						C, W	C, W	C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T							
4	6						C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T	
HOUSING		DM-II	DM-II															

* W = body weight, B = blood for serum, C = clinical scoring, T = tissue;

* W = body weight, B = blood for serum, C = clinical scoring, T = tissue;

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

Aangezien het hier nieuw opgegroeide rhinovirussen betreffen welke nog niet uitgetest zijn in het katoenratten model is nog geen spreiding van de resultaten bekend op het gebied van virale load in de longen (primaire uitleesparameter in het katoenrattenmodel). Er kan dus geen exacte statistische berekening gedaan worden over de groepsgrootte. Als er gekeken wordt naar de publicatie van Overbaugh en Richardson (J. Virology 2005) is gekozen voor een groepsgrootte per euthanasie moment van 6 dieren, bij deze groepsgrootte zal een outlier binnen een groep geen invloed hebben op de significantie. Indien reeds data beschikbaar is van het betreffende wild-type virus, kan dit wel gebruikt worden voor een gedegen power berekening en zal dit in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD. Naar analogie met influenza in muizen is wel al beschreven dat met deze aantallen dieren een significante uitspraak gedaan kan worden over de replicatie kinetiek van het opgegroeide virus voor humaan gebruik in vergelijking met het oorspronkelijke virus in muizen (Memoli et al Clinical Infectious Diseases 2015).

B. De dieren

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

Diersoort:

- **Katoenratten:** vrouwelijk of mannelijk van 6-8 weken oud.
Reeds gepubliceerd onderzoek heeft aangetoond dat katoenratten gevoelig zijn voor infectie met rhinovirus. De keus van mannelijke of vrouwelijke dieren zal gemaakt worden op basis van de beschikbaarheid. Gemengde groepen zijn voor dit model niet mogelijk i.v.m. agressie.

Herkomst: geregistreerde proefdierfokker

Geschatte aantal:

- Katoenratten: 300 dieren in 5 jaar. Er wordt verwacht om een dergelijke studie 1 keer per jaar uit te voeren voor een bepaald virus in twee verschillende doseringen met per dosering vier verschillende euthanasie momenten t.o.v. een positieve en een negatieve controle die beide een enkel euthanasie moment hebben, dus een totaal aantal van 1 studie x 10 groepen van 6 dieren x 5 jaar = 300 dieren

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☐ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: deze experimenten zijn opgezet om te bepalen of de virus stock die geproduceerd is voor gebruik in de mens vergelijkbaar of minder pathogeen is dan het oorspronkelijke virus. Eerste resultaten zullen verkregen worden in vitro, waarbij bestudeerd wordt of het virus een andere groei kinetiek vertoont. Bij verhoogde groei kinetiek kan besloten worden om het in vivo experiment niet uit te voeren (GO/NO GO beslissing). Voor het bepalen van de replicatie in de luchtwegen is het intacte dier benodigd en daarom is dit in vitro niet na te bootsen.

Vermindering: voorafgaand aan het in vivo experiment, zal het virus in vitro bestudeerd worden om te bepalen of de kinetiek van de virus stock afwijkt van het oorspronkelijke virus. Indien een verhoogde replicatie/pathogeniciteit (in vitro) geobserveerd wordt, kan besloten worden om de betreffende stock niet uit te testen in vivo. Bovengenoemde groepsgrootte is bepaald op basis van verwachtingen, echter indien al in vivo resultaten beschikbaar zijn voor het betreffende virus zal dit gebruikt worden voor een nieuwe power berekening. Deze zal in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD.

Verfijning: Meest invasieve behandelingen zullen uitgevoerd worden onder sedatie en dieren worden dagelijks geobserveerd. Indien de klinische symptomen daartoe aanleiding geven (vertonen van ademhalingsproblemen) zullen de dieren frequenter geobserveerd worden. Zo kan voorkomen worden dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment. In het algemeen is rhinovirus een laag-pathogeen virus, daarom zal het veroorzaakte ongerief ook beperkt zijn. Echter, tijdens de challenge fase kunnen klinische symptomen zeer snel tot uiting

komen omdat de replicatie van rhinovirus een logaritmische curve doormaakt. Zo kan bijvoorbeeld aan het eind van de dag besloten worden om laat op de avond nog een extra controle tijdstip in te voegen vanwege dierenwelzijnsstandpunt om te voorkomen dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt worden door het feit dat de dieren gehuisvest zullen worden na infectie onder klasse II of klasse III inperking. Afval (bedding, kadavers en andere gebruikte materialen) zal aangeboden worden voor destructie.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Andere verschijnselen die de dieren kunnen vertonen, maar die niet gepaard gaan met pijn zijn:

- zijn algemene verschijnselen: gewichtsverlies en verminderd actief bij stimulatie
- respiratoire verschijnselen: een verhoogde ademhalingsfrequentie (deze zal bij verergering overgaan in stokkende/schokkende ademhaling)

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De klachten worden veroorzaakt door infectie met rhinovirus en vervolgens replicatie in de luchtwegen (respiratoire verschijnselen).

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

De inschatting is dat de dieren binnen de studie geen pijn zullen ondervinden als gevolg van de infectie. Daarnaast is het zo dat de meest gangbare analgetica in het algemeen naast pijnstillende ook een ontstekingsremmende werking hebben en kunnen dus interfereren in de studie. Daarom is per definitie het gebruik van dergelijke analgetica niet mogelijk in deze experimenten vanwege verstoring van de primaire uitlees parameter.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De dieren zullen dagelijks geobserveerd worden en klinische scores worden genoteerd. Bij matig ongerief (zie hieronder de inschaling van de ongerief klassen) zal het betreffende dier uit de studie worden genomen. Deze klinische ongerief klassificaties zijn:

Licht: 2 algemene symptomen*

Matig: 3 algemene symptomen*

Ernstig: gewichtsverlies van >15% ten opzichte van gewicht bij aanvang van de proef

* algemene symptomen: opgezette vacht, gebogen postuur en verminderd actief

Bij de volgende verschijnselen zullen de dieren direct geëuthanaseerd worden (geclassificeerd als ernstig ongerief):

1. Lethargie: indien een dier lethargisch is (m.a.w. als het niet meer reageert op externe prikkels).

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

100% van de dieren zullen licht ongerief vertonen als gevolg van de infectie met rhinovirus. De verwachting is dat meer dan licht ongerief niet zal voorkomen (<5%) aangezien in het algemeen rhinovirus alleen milde infectie zal induceren in katoenratten.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Het cumulatieve ongerief voor deze experimenten wordt ingeschaald op licht.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Om te controleren of het virus repliceert in de longen en wat de pathologische schade is in de longen, worden deze verwijderd en verder verwerkt voor onderzoek. Dit is niet mogelijk bij in leven laten van het dier.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV



Nistelrooise Baan 3

5347 RE SCHAIJK



**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

AVD905002016413

Bijlagen

2

Datum 30 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 30 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD905002016413. 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: 90500
Naam instelling of organisatie: BioXpert BV
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 54838134
Straat en huisnummer: Nistelrooise Baan 3
Postcode en plaats: 5347 RE SCHAIJK
IBAN: NL72RABO0183605888
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: BioXpert BV

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

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]

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? ☒ [x] 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: 1 mei 2016
Geplande einddatum: 30 april 2021
Titel project: Uittesten van veiligheid van respiratoire humane challenge virussen in verschillende proefdier modellen
Titel niet-technische samenvatting: Testen van de veiligheid van bovenste luchtweg virussen bestemd voor humaan gebruik in muizen, katoenratten en fretten.
Naam DEC: [REDACTED]
Postadres DEC: [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.441,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- ☒ Projectvoorstel
- ☒ Beschrijving Dierproeven
- ☒ Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Schaijk

Datum:

29 maart 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV



Nistelrooise Baan 3

5347 RE SCHAIJK



**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
AVD905002016413

Bijlagen

2

Datum 30 maart 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 30 maart 2016

Vervaldatum: 29 april 2016

Factuurnummer: 16700413

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD905002016413	€ 1.441,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD905002016413
2. Titel van het project: Uittesten van veiligheid van respiratoire humane challenge virussen in verschillende proefdier modellen.
3. Titel van de NTS: Testen van de veiligheid van bovenste luchtweg virussen bestemd voor humaan gebruik in muizen, katoenratten en fretten.
4. Type aanvraag:
 - ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: [REDACTED]
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☒ ontvangen door DEC: 30 -03-2016
 - ☒ aanvraag compleet: 13-04-2016
 - ☒ in vergadering besproken: 13-04-2016 en 18-05-2016
 - anderszins behandeld: kleine commissie 04-04-2016
 - termijnonderbreking(en) van 04-04-2016 / tot 07-04-2016
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - ☒ aanpassing aanvraag: 07-04-2016 en 03-05-2016
 - ☒ advies aan CCD: 20-05-2016
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 04-04-2016 (pre-screening) en 28-04-2016 (finale bijstelling)
 - Strekking van de vragen:
 - o De aangegeven doelcategorieën lijken niet geheel in overeenstemming met de inhoud.

- U zou de aanvraag kunnen versterken door beter aan te geven waarom de drie testtrajecten samen een toetsbare eenheid vormen.
 - Aantallen dieren en aantallen malen dat de verschillende modellen zullen worden ingezet behoeven nadere onderbouwing.
 - U hebt verzuimd om de haalbaarheid van de doelstelling te onderbouwen.
 - Belang van de doelstelling: dit onderzoek richt zich in de eerste plaats op het waarborgen van de veiligheid van de proefpersonen.
 - In welke zin er sprake is van kwantitatieve bepalingen?
 - Wanneer en hoe zal worden besloten een virus te testen in deze modellen? Beschikt de aanvrager steeds over alle noodzakelijke informatie van de opdrachtgever om hierover zelf een wetenschappelijk verantwoord besluit te kunnen nemen?
 - Implanteren van een datalogger behoeft rechtvaardiging.
 - Bij de fretten kan klaarblijkelijk worden volstaan met drie dieren per groep. Waarom zijn er dan toch 6 muizen/katoenratten per groep nodig?
 - Het verdient aanbeveling de keuze van het geslacht van de dieren steeds te vermelden en zo goed mogelijk te onderbouwen.
 - Punt E behoeft nadere uitwerking i.v.m. wettelijk vereist onderzoek.
 - Discrepantie tussen de ernst van de humane eindpunten (J) en de inschatting van het cumulatieve ongerief bij K.
 - Ongeriefcategorie van de fretten dient naar het oordeel van de DEC te worden ingeschat als matig.
 - Redactionele aspecten: Nader verduidelijking en toespitsing van diverse tekstpassages in de NTS.
- Datum antwoord: 07-04-2016 en 03-05-2016
 - Strekking van het de antwoorden: De vragen en opmerkingen van de DEC zijn naar tevredenheid beantwoord; aanvraag na bijstelling volledig en duidelijk.
 - De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t., de DEC beschikt zelf over de relevante expertise.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Geen van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project of de aanvrager.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - ☒ uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
 - ☒ wettelijk vereist
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Bovenste luchtweginfecties door virussen (influenza, RSV en rhinovirus) zorgen jaarlijks voor een hoge ziektelast. Dit leidt tot een hoge economische schade. Daarnaast kunnen bij de zogenaamde risicogroepen (baby's, jonge kinderen, bejaarden, chronisch zieken en patiënten met een verzwakt afweersysteem) ernstige complicaties en zelfs sterfte optreden. Vanwege het feit dat deze bovenste luchtweginfecties een hoge ziektelast en een hoge economische schade veroorzaken, zoeken farmaceutische bedrijven naar vaccins en medicijnen om de ziektelast en economische schade te verlagen. Tevens kunnen deze vaccins en medicijnen ingezet worden bij ernstigere ziektebeelden in risico groepen. Tot voor kort werden dergelijke vaccins en medicijnen alleen uitgetest in proefdieren, maar in de afgelopen jaren is voor relatief milde luchtweg infecties door virussen ook de mens als studie object in opkomst. Het grote voordeel hiervan is de controleerbaarheid van de studie. In tegenstelling tot bij een groot opgezette klinische veldstudie, kunnen bij een humane challenge in een vaccin- of medicijntest de deelnemers uitvoerig gescreend worden en is van alle deelnemers bekend of ze geïnfecteerd zijn en dus of het middel gewerkt heeft. Vanuit de

regelgevende instanties wordt geëist dat dergelijke virussen die gebruikt zullen worden in de mens, worden getest op veiligheid. Met name dient te worden aangetoond dat ze na het kweken niet virulenter zijn geworden dan het oorspronkelijke virus. De experimenten omschreven in deze aanvraag hebben tot doel om te testen of de challenge virussen veilig zijn (mild genoeg zijn) voor gebruik in de mens.

De commissie schat het belang van het project in als een **substantieel** belang, niet alleen omdat het van belang is de veiligheid van de humane proefpersonen te garanderen, maar ook omdat het van belang is dat de vaccins en medicijnen in een zo relevant mogelijk model worden getest. Deze experimenten in dieren dragen er aan bij dat dit mogelijk wordt.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De instelling heeft een uitgebreide ervaring met het uitvoeren van dit soort testen (in opdracht van derden) en beschikt over gespecialiseerde kennis van de gebruikte diermodellen en van de respiratoire infecties die in deze diermodellen kunnen optreden.
5. Er is in wettelijk opzicht geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De diersoorten die worden gebruikt, muizen, katoenratten en fretten zijn gebruikelijk voor dit type onderzoek naar respiratoire virussen. De keuzes met betrekking tot deze zaken zijn voldoende wetenschappelijk onderbouwd.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Naar verwachting zullen alle dieren (muizen, katoenratten en fretten) na toediening van de viruspreparaten niet meer dan licht ongerief vertonen aangezien het de bedoeling is dat de virussen slechts milde verschijnselen veroorzaken. Bij alle fretten komt het cumulatieve ongerief uit op matig, omdat deze dieren in het kader van de studies een aantal handelingen onder anesthesie ondergaan, zoals het chirurgische implanteren van een temperatuurlogger, inoculatie en dagelijkse bemonstering. In een studie die bedoeld is om de veiligheid van een viruspreparaat te testen, kan bij hoge uitzondering blijken dat een bepaald preparaat niet veilig is en toch

ernstige klinische symptomen veroorzaakt. Waar nodig zal daarom de observatie frequentie worden verhoogd en zullen strikte humane eindpunten worden toegepast. De commissie kiest er desondanks bewust voor om het ongerief niet voor een klein percentage van de dieren als ernstig te classificeren, aangezien zij de kans daarop vrijwel nihil acht.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. Vooraf kan in vitro getest worden of de virussen waar het om gaat voldoende infectieus zijn, en dit gebeurt ook. Aantonen dat de gekweekte virus stocks niet virulenter zijn en geen ernstiger verschijnselen veroorzaken dan de oorspronkelijke virussen, kan echter alleen in daarvoor diermodellen met een functionerend immuunsysteem die daarvoor geschikt zijn gebleken in eerder onderzoek.

Met betrekking tot vervanging dient verder opgemerkt te worden dat de experimenten in dit project het implementeren van een vervangingsalternatief mogelijk maken. De werkzaamheidstesten van vaccins en medicijnen in mensen zijn een vervanging voor dierproeven.

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. De aanvrager voert de studies als zogenaamde CRO uit voor derden. Het aantal dieren is gebaseerd op het verwachte aantal verzoeken voor het uitvoeren van testen en op een realistisch aantal varianten/stammen van de virussen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Alle handelingen die daarvoor in aanmerking komen worden uitgevoerd onder anesthesie en er wordt adequate pijnbestrijding toegepast. Indien van toepassing zullen kandidaat virussen (indien meerdere beschikbaar zijn) in een diermodel uitgetest worden waarin geen of zeer milde klinische verschijnselen verwacht worden (muis, katoenrat). Een geschikt virus zal vervolgens in een meer klinisch relevant diermodel getest worden op veiligheid, waarbij wel klinische verschijnselen verwacht kunnen worden en door uitgebreide bemonstering en observatie meer ongerief optreedt (fret). Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de overwegingen onder bovenstaand punt C (1 t/m 9) komt de commissie tot de volgende ethische afweging.

Bovenste luchtweginfecties door virussen (influenza, RSV en rhinovirus) zorgen voor grote economische schade. Daarnaast kunnen bij de zogenaamde risicogroepen (baby's, jonge kinderen, bejaarden, chronisch zieken en patiënten met een verzwakt afweersysteem) ernstige complicaties en zelfs sterfte optreden. Farmaceutische bedrijven zijn daarom op zoek naar vaccins en medicijnen om de ziektelast en economische schade te verlagen. Tot voor kort werden dergelijke vaccins en medicijnen alleen uitgetest in proefdieren, maar in de afgelopen jaren is voor relatief milde luchtweginfecties door virussen ook de mens als proefpersoon in opkomst. In tegenstelling tot bij een groot opgezette klinische veldstudie, kunnen bij een humane challenge in een vaccin- of medicijntest de deelnemers uitvoerig gescreend worden en is van alle deelnemers bekend of ze geïnfecteerd zijn en dus of het middel gewerkt heeft. Vanuit de regelgevende instanties wordt geëist dat dergelijke virussen die gebruikt zullen worden in de mens, worden getest op veiligheid. Met name dient te worden aangetoond dat ze na het kweken niet virulenter zijn geworden dan het oorspronkelijke virus. De experimenten omschreven in deze aanvraag hebben tot doel om te testen of de challenge virussen veilig zijn (mild genoeg zijn) voor gebruik in de mens.

De commissie schat het belang van het project in als een **substantieel** belang, niet alleen omdat het van belang is de veiligheid van de humane proefpersonen te garanderen, maar ook omdat het van belang is dat de vaccins en medicijnen in een zo relevant mogelijk model worden getest. Deze experimenten in dieren dragen er aan bij dat het mogelijk wordt de effectiviteit van de interventies direct in mensen te testen.

Tegenover dit substantiële belang staat het feit dat alle muizen en katoenratten in de experimenten een lichte welzijnsaantasting zullen ondervinden. De welzijnsaantasting van alle fretten zal matig zijn.

De commissie is ervan overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling is

gegeven 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 naar het oordeel van de commissie onvermijdelijk, wil men de doelstellingen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hierboven geschetste substantiële belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren 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

X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



Format

Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- ☐ Fundamenteel onderzoek
- ☒ Translationeel of toegepast onderzoek
- ☒ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- ☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- ☐ Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- ☐ Hoger onderwijs of opleiding
- ☐ Forensisch onderzoek
- ☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

In het kader van de ontwikkeling van interventie strategieën tegen respiratoire virussen (in het bijzonder influenza, respiratoir syncytieel virus en rhinovirus) biedt de aanvrager van dit projectvoorstel verschillende preklinische modellen aan om de veiligheid van deze interventie strategieën uit te testen. Daarnaast kunnen deze modellen ook gebruikt worden om virus stocks van bovengenoemde virussen uit te testen op hun veiligheid voor humaan gebruik (zogenaamde humane challenge modellen). Deze preklinische modellen zijn door de aanvrager opgezet of voor de aanvrager beschikbaar en kunnen gebruikt worden om virus stocks verschaft door derden (in het algemeen farmaceutische bedrijven), maar ook in huis geproduceerd uit te testen.

Bovengenoemde virussen zorgen jaarlijks voor een grote ziektelast ondanks het feit dat er bijvoorbeeld een actief jaarlijks vaccinatie beleid is tegen seizoens influenza. Tot een aantal jaar geleden werden interventie strategieën alleen uitgetest in preklinische modellen, echter in de afgelopen jaren is zeker voor relatief milde respiratoire virus infecties ook het humane challenge model in opkomst. Het grote voordeel van dit model is de controleerbaarheid van de studie. Dit in tegenstelling tot een grote klinische studie waarbij het moeilijk is om te voorspellen bij welk aantal deelnemers significantie bereikt wordt in de test resultaten tussen specifiek behandelde en placebo behandelde deelnemers. Daarbij is het soms onduidelijk of de betreffende deelnemer een infectie heeft opgelopen omdat een actief virologisch screeningsbeleid op alle deelnemers logistiek moeilijk is. Bij een humane challenge waarbij een interventie strategie uitgetest wordt, kunnen de deelnemers uitvoerig gescreend worden en is van alle deelnemers bekend of ze geïnfecteerd zijn en dus of de interventie strategie gewerkt heeft.

De virussen die tot nu toe hiervoor in aanmerking komen zijn:

- Milde humane influenza virussen (zogenaamde seizoens influenza virussen)
- Humaan respiratoir syncytieel virus
- Humaan rhinovirus

Van deze bovenstaande virussen moeten voor de humane challenge speciale virusstocks opgegroeid worden in geschikte en goedgekeurde cellijnen. Het is echter niet gegarandeerd dat het relatief milde karakter voor opgroeien in vitro nog van toepassing is na het maken van de humane challenge stock. Alhoewel de mutatie frequentie van deze RNA virussen in het algemeen relatief hoog is zeker onder druk van het immuunsysteem, is dit minder van toepassing voor in vitro opgroeien van virus. Desondanks dienen dergelijk opgegroeide virusstocks uitgetest te worden op hun veiligheid al dan niet in vergelijking met het oorspronkelijke donor virus. Deze laatste keuze zal voornamelijk bepaald worden op beschikbaarheid van dit oorspronkelijke virus. Indien dit een primair isolaat is van een patiënt zal meestal niet voldoende materiaal aanwezig zijn of is de titer van het materiaal niet hoog genoeg om het ook in een dierstudie te gebruiken. Betreft het reeds een bestaande virus stock, dan zou het kunnen zijn dat het oorspronkelijke virus wel degelijk meegenomen kan worden. Indien het oorspronkelijke virus niet beschikbaar is, zal een vergelijkbaar virus (positieve controle) meegenomen worden ter controle.

De lage pathogeniciteit van de opgegroeide challenge stock voor humaan gebruik dient bevestigd te worden in één of meerdere diermodellen, waarbij het kleinste diermodel gekozen wordt dat het meest representatief is voor de gekozen primaire uitleesparameter. In het algemeen staat omschreven in de Pharmacopeia waaraan degelijk biologische reagentia voor humaan gebruik moeten voldoen, maar voor deze specifieke vraagstelling bestaan geen vereisten. Als richtlijn zullen opgegroeide virus stocks voor humane challenge niet pathogener mogen zijn of niet leiden tot hogere viral load dan het oorspronkelijke virus of de positieve controle. Op basis van de resultaten verkregen in de verschillende dierexperimenten, die beschreven zijn in deze aanvraag, kan een uitspraak gedaan worden over de veiligheid van de hier uit te testen virus stocks. In het geval van een humane influenza virus stock bestaat een wetenschappelijke publicatie van Memoli et al. (Clinical Infectious Diseases 2015, Appendix 1) waarin omschreven staat hoe de auteurs het betreffende virus hebben uitgetest. Voor de andere twee bovengenoemde virussen bestaat niet zo'n richtlijn/publicatie, echter gepubliceerd werk en eigen onderzoek heeft wel de gevoeligheid van de voorgedragen diermodellen voor deze virussen bevestigd.

De experimenten zoals hier beschreven bevinden zich in de preklinische fase van het uittesten van de virus stocks voor humaan gebruik. Voorafgaand aan de preklinische studie zal als eerste gecontroleerd

worden door ofwel de opdrachtgever (derden) of door de aanvrager of de virus stocks voldoende infectieus zijn (zoals omschreven bij vervanging in de afzonderlijke bijlagen) in in vitro test systemen. Zodra de virus stock(s) bewezen infectieus is(zijn) kan aangevangen worden met de preklinische studie, die als doel heeft om aan te tonen dat de gegenereerde virus stock voor humaan gebruik veilig is volgens de primaire uitleesparameter die omschreven is in de afzonderlijke bijlagen. Deze preklinische studies hebben een kwantitatief karakter, resultaten verkregen binnen de experimenten met verschillende doses van het virus of tussen het oorspronkelijke virus (al dan niet uit historische resultaten) en het opgegroeide virus zullen direct met elkaar vergeleken worden. De voorwaarde voor alle experimenten ongeacht de primaire uitleesparameter zal zijn dat de virus stock voor humane challenge geen significant hogere bevindingen wat betreft virulentie of pathogeniciteit mag hebben dan het oorspronkelijke virus of de meegenomen positieve controle. Deze bevindingen zijn afhankelijk van het virus en het gekozen diermodel.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

De algemene doelstelling van het project is het uittesten van de veiligheid van humane respiratoire virussen voor humane challenge door middel van een kwantitatieve bepaling. Uitgangspositie hierin is het oorspronkelijke virus, waarbij de virus stock die bestemd is voor humaan gebruik vergelijkbaar of minder virulent dan wel pathogeen (afhankelijk van de primaire uitleesparameter) mag zijn. De primaire uitleesparameter zal afhangen van de combinatie van preklinisch model en virus. Per combinatie van preklinisch model en virus is de primaire uitleesparameter beschreven in de verschillende bijlagen bij dit projectvoorstel. Voor de kleine diermodellen (muizen en katoenratten) zal de primaire uitleesparameter de virologie zijn, namelijk viral load in de longen na infectie. Voor de fretten zal de primaire uitleesparameter pathologie zijn in de longen.

Dit soort studies worden door de aanvrager uitgevoerd om te kunnen voldoen aan de vraag van derden om de veiligheid van humane respiratoire virussen voor humaan gebruik uit te testen en om advies uit te brengen richting regelgevende instanties (WHO en EMA). Vanwege de grote expertise van de aanvrager op het gebied van humane respiratoire virussen en haar relevante preklinische modellen kunnen de resultaten verkregen in deze studies direct gerapporteerd worden aan de regelgevende instanties en vrijgifte van deze virussen voor humaan gebruik. Vanwege de hoge kwaliteit van de studies kunnen deze ook leiden tot publicatie in peer-reviewed tijdschriften en leiden tot veiligheidsrichtlijnen welke op dit moment nog niet duidelijk omschreven zijn voor deze virussen. Uiteindelijk zullen de humane challenge virussen ingezet worden om interventie strategieën uit te testen in de mens en resultaten uit dergelijke studies kunnen leiden tot vrijgifte voor deze interventie strategieën.

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

De dierproeven beschreven in dit project voorstel zullen gebruikt worden om de veiligheid van humane respiratoire virussen voor gebruik in de mens te bestuderen en te rapporteren aan de regelgevende instanties. Bij bewezen veiligheid kunnen deze humane respiratoire virussen ingezet worden voor het uittesten van interventie strategieën in de mens. Indien in de mens aangetoond kan worden dat de uit te testen interventie strategie effectief is, zullen de verkregen resultaten gebruikt worden in het registratie proces van die betreffende interventie strategie.

Virale bovenste luchtweginfecties zorgen jaarlijks voor een hoge ziektelast en deze zorgen voor een hoge economische schade. Als voorbeeld: voor alleen de Verenigde Staten, een samenleving vergelijkbaar met West-Europa, is uitgerekend dat de economische schade voor niet-influenza bovenste luchtweg infecties

op kan lopen tot 40 miljard dollar (Fendrick Archiv Intern Med 2003). Hierin zijn (al dan niet effectieve en relevante) directe medische kosten meegenomen, maar ook indirecte kosten, zoals bijvoorbeeld het opnemen van vrije dagen door ouders met kinderen die een infectie doormaken. Daarbovenop kunnen bij de zogenaamde risicogroepen (baby's, jonge kinderen, bejaarden, chronisch zieken en patiënten met een verzwakt afweersysteem) ernstige complicatie optreden en zelfs sterfte voorkomen.

Vanwege het feit dat deze bovenste luchtweginfecties een hoge ziektelast en een hoge economische schade veroorzaken, zoeken farmaceutische bedrijven naar interventie strategieën om deze te verlagen. Tevens kunnen deze interventie strategieën ook ingezet worden bij ernstigere ziektebeelden in risico groepen.

Hoewel het uittesten in preklinische modellen een belangrijke stap is in de vrijgave van dergelijke interventie strategieën, wordt steeds vaker het humane challenge model gebruikt in dergelijk onderzoek. Hierbij speelt ook mee dat deze relatief milde infecties ook een beperkt ziektebeeld vertonen in de verschillende preklinische modellen, waardoor het soms lastig is om een behandelingseffect aan te tonen in deze niet natuurlijke gastheren.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Het doel van deze projectaanvraag is het uitvoeren van vereiste veiligheidstesten in preklinische studies van humane respiratoire virussen welke uiteindelijk in het humane challenge model gebruikt kunnen worden bij bewezen veiligheid.

Voor de verschillende virussen aangehaald in deze aanvraag zijn één of twee preklinische modellen beschikbaar. Indien twee preklinische modellen beschikbaar zijn, zal een keuze gemaakt worden tussen de twee. In het geval van twee modellen, is het kleinste model (muis voor influenza en katoenrat voor RSV) een minder klinisch relevant model. Indien meerdere kandidaat virus stocks beschikbaar zijn kan in het kleinste model een eerste selectie gemaakt worden, waarna voor een meer klinisch relevant model gekozen kan worden voor een kandidaat virus voor humaan gebruik. In alle experimenten zal op een kwantitatieve manier beoordeeld worden of de virus stock voor humaan gebruik veilig is. Hiertoe zal de voor die betreffende combinatie van virus en dierspecies een primaire uitleesparameter gekozen worden (virologie of pathologie, zie voor de primaire uitleesparameter de afzonderlijke bijlagen), welke gelijkwaardig of verminderd pathogeen moet zijn dan het oorspronkelijke virus of de meegenomen positieve controle. In het algemeen geldt dat voor de kleine modellen (muis en katoenrat) de primaire uitleesparameter virus replicatie in de longen is en voor het grote model (fret) pathogeniciteit.

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

In alle hier voorgelegde dierproeven zal bepaald worden of een nieuw opgegroeide virus stock vergelijkbaar of verminderd pathogeen is dan het oorspronkelijke virus. Deze bepaling zal op een kwantitatieve manier uitgevoerd worden en per dierproef (combinatie van dierspecies en virus) zal bepaald worden wat de primaire uitleesparameter is. Indien van toepassing kan het zijn dat een positieve controle (oorspronkelijke virus of vergelijkbaar relevant virus) en/of een negatieve controle meegenomen wordt. Een dergelijke negatieve controle is om aan te tonen dat bij gelijke (be)handelingen geen effect wordt waargenomen, die toegeschreven kan worden aan de behandeling. Hierbij kan gedacht worden aan meer conventionele modellen, zoals de fret, waarbij bijvoorbeeld minimale macroscopische schade aan de longen inherent is aan het model en niet te wijten is aan de infectie met het virus. Indien mogelijk zullen resultaten van de positieve controle verkregen worden uit reeds uitgevoerde experimenten met het betreffende virus om tegemoet te komen aan vermindering van proefdiergebruik. Op basis van primaire uitleesparameter zijn er twee hoofdlijnen van de verschillende onderdelen:

Virulentie:

Dieren zullen geïnfecteerd worden met het betreffende virus en al dan niet met een positieve en een negatieve controle. Op verschillende tijdstippen (vroeg en laat) na infectie zal een aantal dieren geëuthanaseerd worden om onder andere de virale load te bepalen in de luchtwegen. De vroege

tijdstippen zijn gekozen om tijdens de log-fase van de virus replicatie te bestuderen of er verschillen zijn tussen de verschillende doseringen/virussen op basis van virulentie. Het late tijdstip is gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. Het eerste (verlengde uitscheiding van het virus) zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus.

Pathogeniciteit:

Dieren zullen geïnfecteerd worden met het betreffende virus en al dan niet met een positieve en een negatieve controle. Op verschillende tijdstippen (vroeg en laat) na infectie zal een aantal dieren geëuthanaseerd worden om onder andere de pathogeniciteit te bepalen in de luchtwegen. De vroege tijdstippen zijn gekozen om tijdens de log-fase van de virus replicatie dit te bestuderen tussen de verschillende doseringen/virussen. Het late tijdstip is naast de beoordeling middels pathologie gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. De verlengde uitscheiding van het virus zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

De verschillende onderdelen dienen allemaal hetzelfde doel, namelijk onderzoek naar de veiligheid van verschillende humane respiratoire virussen voor gebruik in mensen. Afhankelijk van de primaire uitleesparameter zal een keuze gemaakt worden tussen de verschillende modellen zoals beschreven in de verschillende modules, indien meerdere modellen beschikbaar zijn. Daarnaast is het wel zo dat als in het gekozen model verhoogde virulentie of pathogeniciteit geobserveerd wordt, het betreffende virus gediskwalificeerd wordt voor humaan gebruik. In het geval er meer dan één diersmodel beschikbaar is, zal het kleinste diersmodel bij meerdere kandidaat virussen ingezet worden voor een eerste screening van de beschikbare virussen. Een virus dat voldoet aan het veiligheidsprofiel in dit model zal vervolgens in een meer klinisch relevant (en groter) model uitgetest worden (GO). Een virus dat niet voldoet aan het veiligheidsprofiel zal gediskwalificeerd worden voor gebruik in de mens (NO GO). Dit laatste kan zowel in het kleine diersmodel op basis van virulentie als in het grote model op basis van pathogeniciteit besloten worden.

3.4.4 Benoem de typen diersproeven. Vul per type diersproef een bijlage Beschrijving diersproeven in.

Volgnummer	Type diersproef
1	Veiligheid van influenza virus voor humaan gebruik
2	Veiligheid van respiratoir syncytieel virus voor humaan gebruik
3	Veiligheid van rhinovirus voor humaan gebruik
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	90500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Veiligheid van influenza virus voor humaan gebruik

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Voor het onderzoek naar influenza virussen is het ook mogelijk om gebruik te maken van gezonde vrijwilligers in plaats van proefdieren. Om de veiligheid van deze vrijwilligers te waarborgen is het van belang dat de virussen waarmee ze worden geïnfecteerd van te voren worden getest op virulentie en pathogeniciteit. Bij de productie van een virus stock voor gebruik in de mens wordt het betreffende virus in vitro opgegroeid. Om te kunnen garanderen dat het virus dat de mens in gaat nog steeds hetzelfde fenotype heeft, zal deze eerst in dieren getest moeten worden. Dergelijke vereisten zijn in het algemeen omschreven in de Pharmacopeia, vertaald door Memoli et al (Clinical Infectious Diseases 2015, Appendix 1) en toegepast in de genoemde publicatie voor wat betreft het uittesten van influenza virus in muizen. Voor influenza zijn verschillende diermodellen beschikbaar, die al dan niet translationeel zijn naar de mens. Het kleinst mogelijke model is de muis en alhoewel het klinische beeld niet overeenkomt met dat van de mens en muizen verminderd vatbaar zijn voor niet muis-geadapteerde influenza stammen, kan dit model wel gebruikt worden om de virus replicatie te bestuderen in de longen. Dit model kan beschouwd worden als een eerste keuze model, waarna voor een meer klinisch relevant model gekozen kan worden voor een kandidaat virus voor humaan gebruik. Indien meerdere kandidaat virus stocks beschikbaar zijn kan in het muizenmodel een eerste selectie gemaakt worden op basis van virulentie. Virus stocks die meer virulentie vertonen dan de controle (het oorspronkelijke virus of de meegenomen relevante positieve controle), zullen uitgesloten worden voor humaan gebruik en dus niet verder getest worden in het frettenmodel (NO GO). Kandidaat virus stock(s) die verminderde of gelijke virulentie vertonen in vergelijking met de controle kan (kunnen) vervolgens uitgetest worden in het fretten model (GO). Dit frettenmodel is een meer relevant model, waarbij de aanhechting van het virus, het ziekteverloop en de uiteindelijke pathologie vergelijkbaar is met de mens. Resultaten verkregen in het frettenmodel zijn leidend voor de veiligheid in de mens en bij verminderde of gelijke pathologie in vergelijking met de controle kan de betreffende virus stock vrijgegeven worden voor gebruik in de mens (GO). Bij verhoogde pathologie in vergelijking met de controle zal het

betreffende virus alsnog gediskwalificeerd worden voor gebruik in de mens (NO GO).

Zoals hierboven genoemd is de primaire uitkomst parameter in deze experimenten afhankelijk van het gekozen diermodel. Deze is voor de verschillende modellen:

- Muizen: virus replicatie in de longen (virulentie)

Fretten: long pathologie (pathogeniciteit)

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Muizen:

Nadat de dieren zijn aangekomen binnen de faciliteit zullen ze een acclimatisatie periode hebben van minimaal 1 week. Dieren worden voor de proef gewogen, geïdentificeerd door middel van oorknip en er wordt bloed afgenomen via de wangprik (~100ul) voor serum (het zogenaamde nul-monster). Deze hoeveelheid serum (~50ul) is voldoende om in het geval van onverwachte resultaten op basis van serologie uit te sluiten dat de dieren op voorhand een immunologische respons hadden die van invloed zou kunnen zijn op de infectie. Daarnaast zal dit nul-monster ook dienen als referentie in de serologische analyses. Nadat de dieren zijn gesedeerd (isofluraan 3-4%), worden de dieren intranasaal (50µL) geïnoculeerd. Op een aantal vroege tijdstippen na inoculatie wordt een aantal dieren van iedere groep geëuthanaseerd, waarna de longen worden verzameld. Deze vroege tijdstippen zijn gekozen om tijdens de log-fase van de virus replicatie te bestuderen of er verschillen zijn tussen de verschillende doseringen/virussen op basis van virulentie en pathologie. Het tijdstip van deze vroege momenten zal afhangen van het betreffende virus en zal bepaald worden op basis van reeds beschikbare data of via literatuur onderzoek. De overgebleven dieren worden aan het einde van het experiment (dag 14) geëuthanaseerd en ook hier worden de longen verzameld voor virologie en pathologie. Dit late tijdstip is gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. Het eerste (verlengde uitscheiding van het virus) zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus. Tijdens de gehele studie worden de dieren dagelijks gewogen en wordt er gekeken naar klinische verschijnselen. Daarnaast zullen dieren vroegtijdig uit de studie worden gehaald indien het humane eindpunt wordt bereikt. Hieronder is een voorbeeld van een dergelijke studie waarin een bepaald(e) influenza virus (dosis) getest wordt in muizen. Daarnaast zal in een dergelijke studie een negatieve en een positieve controle meegenomen worden. De positieve controle dient om de vergelijking te maken met het uit te testen virus en de negatieve controle als nul-referentie ten opzichte van de geïnfecteerde dieren. Voor beide controles zal het tijdstip van euthanasie beschreven en beargumenteerd worden in het werkprotocol.

				<i>Infection phase</i>																							
Group		No/Group		d -7																							
						d -1	d0		d1	d2	d3		d4	d5		d6	d7		d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14		
1		6		entry of animals in the preclinical facility		C,W, B	Intranasal Administration of influenza virus, C, W	C,W	C,W	C, B, W, Euthanasia, T																	
2		6								C, W		C, W	C, B, W, Euthanasia, T														
3		6								C, W		C, W	C, W		C, W	C, B, W, Euthanasia, T											
4		6								C, W		C, W	C, W		C, W	C, W		C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T		
HOUSING		DM-II				DM-II																					

* W = body weight, B = blood for serum, C = clinical scoring, T = tissue;

Fretten:

Nadat de dieren zijn aangekomen binnen de faciliteit zullen ze een acclimatisatie periode hebben van minimaal 1 week. Minimaal 14 dagen voor de start van het experiment zal een zgn. nul-bloedmonster voor referentie in analyses afgenomen worden onder sedatie via de vena jugularis. Dit serum zal gebruikt worden om in het geval van onverwachte resultaten op basis van serologie uit te sluiten dat de dieren op voorhand een immunologische respons hadden die van invloed zou kunnen zijn op de infectie. Daarnaast zal dit nul-monster ook dienen als referentie in de serologische analyses. Hierna zal een datalogger ingebracht worden. Dit zal gebeuren door middel van een operatie waarbij de buikwand geopend zal worden en de temperatuurlogger via de linea alba in de peritoneale holte geplaatst zal worden waarna de wond gehecht

wordt. Deze datalogger meet de lichaamstemperatuur en/of activiteit van het dier gedurende de looptijd van de studie (klinische parameter). Peri- en postoperatief zullen de dieren topicale pijnbestrijding krijgen om het genezingsproces te bevorderen en na afloop van de operatie zal de werking van de anesthesie geantagoneerd worden. Deze dataloggers worden gebruikt aangezien fretten (zeker bij milde infecties) klinisch niet duidelijk te scoren zijn ondanks het feit dat in de pathologie (zowel gross als microscopisch) wel degelijk veranderingen te zien zijn. De aldus verkregen data (temperatuur en/of activiteit) dragen bij het analyseren van het model, primaire en secundaire uitleesparameters. Op dag -1 zullen alle dieren gewogen en bemonsterd (neus en keel) worden en op dag 0 via de intranasale route geïnoculeerd worden met een volume van 300ul. Het nul-monster wordt een dag voor de daadwerkelijke inoculatie uitgevoerd om geen interferentie te hebben met de inoculatie zelf. Aangezien hier een uitspraak gedaan zal worden over de veiligheid in gebruik bij de mens, wordt ook de route identiek gehouden (ter vergelijking: een dergelijk challenge in mensen wordt ook via de intranasale route gegeven). Na infectie zal de anesthesie geantagoneerd worden en zullen de dieren dagelijks bemonsterd worden uit de bovenste luchtwegen (keel en neus) onder anesthesie en zal de Body Score Index bepaald worden. Bij makkelijk palpabele ribben zal besloten worden om vanuit welzijnsstandpunt de dieren te wegen tijdens hetzelfde anesthesie moment. Op gezette tijden na infectie (of eerder indien een dier het humane eindpunt bereikt) zullen dieren geëuthanaseerd worden voor het verzamelen van relevant weefsel. De overgebleven dieren worden aan het einde van het experiment (dag 14) geëuthanaseerd en ook hier worden de longen verzameld. Dit late tijdstip is gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. Het eerste (verlengde uitscheiding van het virus) zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus. Daarnaast zullen de dieren dagelijks tot het einde van de proef geobserveerd worden om te bepalen of er klinische verschijnselen te zien zijn. Hieronder is een voorbeeld van een dergelijke studie waarin twee (verschillende doses van een) influenza virus getest worden in fretten in vergelijking met negatieve en een positieve controle. De route van de negatieve danwel positieve controle kan afwijken van de route voor de uit te testen virus stock (bijvoorbeeld intratracheaal of zowel intratracheaal als intrasasaal), dit zal op geleide van historische gegevens gaan en zal beargumenteerd worden in het werkprotocol.

		Preparation*		Challenge & Sampling**																				
Group	No/Group	d -21	d -14**																					
				d -1	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14					
1	3	entry of animals into the preclinical facility	W	Implantation data logger, B*	C, S, W	C, S	C, S	Negative control												C, B, S, Euthanasia, T				
2	3							Virus (dose) 1	C, S, Euthanasia, T															
3	3									C, S	C, S, Euthanasia, T													
4	3											C, S	C, S	C	C, B, S, Euthanasia, T									
5	3															C, S	C, S	C	C, S	C	C	C, S	C	C
6	3									Virus (dose) 2	C, S, Euthanasia, T													
7	3											C, S	C, S, Euthanasia, T											
8	3													C, S	C, S	C	C, B, S, Euthanasia, T							
9	3									C, S	C, S							C	C, S	C	C	C, S	C	C
10	3											Positive control	C, S	C, S	C, S, Euthanasia, T									
HOUSING		DM-I/II		DM-II/isolator																				

Animals seronegative for circulating Influenza viruses and Aleutian Disease will be brought into the animal facility

* S = nose & throat swabs, B = blood for serum, C = clinical scoring, W = body weight, T = tissue;

** all animals will be implanted with a pre-programmed data logger

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

Muizen:

Aangezien het hier nieuwe influenza virussen betreffen welke nog niet uitgetest zijn in het muizen model is nog geen spreiding van de resultaten bekend op het gebied van virale load in de longen (primaire uitleesparameter in het muizenmodel). Er kan dus geen exacte statistische berekening gedaan worden over de groepsgrootte. Als er gekeken wordt naar de publicatie van Overbaugh en Richardson (J. Virology 2005) is gekozen voor een groepsgrootte per euthanasie moment van 6 dieren, bij deze groepsgrootte zal een outlier binnen een groep geen invloed hebben op de significantie. Indien reeds data beschikbaar is van het

betreffende wild-type virus, kan dit wel gebruikt worden voor een power berekening en zal dit in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD. Wel is al beschreven dat met deze aantallen dieren een significante uitspraak gedaan kan worden over de replicatie kinetiek van het opgegroeide virus voor humaan gebruik in vergelijking met het oorspronkelijke virus in muizen (Memoli et al Clinical Infectious Diseases 2015).

Fretten:

Aangezien het hier nieuwe influenza virussen betreffen welke nog niet uitgetest zijn in het fretten model is nog geen spreiding van de resultaten bekend op het gebied van de pathologie (primaire uitleesparameter in het frettenmodel). Er kan dus geen exacte statistische berekening gedaan worden over de groepsgrootte. Per euthanasie moment zullen drie dieren gebruikt worden. Aangezien in dit experiment de verschillende groepen met elkaar vergeleken kunnen worden, is het mogelijk om de experimenten met een dergelijk laag aantal dieren per groep uit te voeren. Eerdere vergelijkbare experimenten (dose-finding van influenza virussen in fretten) hebben laten zien dat met dergelijke kleine groepen een goed onderbouwde keuze gemaakt kan worden over de dosis van het betreffende virus. De verwachting is dat in deze experimenten dergelijke aantallen ook voldoende zijn om te komen tot een gedegen uitspraak in de resultaten. Daarnaast is het zo dat in tegenstelling tot de muizen, in de fretten andere uitleesparameters (secundaire uitleesparameters) beschikbaar zijn naast de primaire uitleesparameter. Deze secundaire uitleesparameters zullen ervoor zorgen dat met kleinere groepen significante verschillen aangetoond kunnen worden tussen de groepen. Indien reeds data beschikbaar is van het betreffende wild-type virus, kan dit wel gebruikt worden voor een power berekening en zal dit in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD.

B. De dieren

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

Diersoort:

- **muizen (stam nader te bepalen):** vrouwelijk en/of mannelijk van 6-8 weken oud.
Reeds gepubliceerd onderzoek zal basis zijn voor de keuze van de muizenstam en de leeftijd. Indien deze voorkennis niet beschikbaar is, zal naar homologie gekeken worden voor de meest gevoelige muizenstam. Wat betreft het geslacht zal in eerste instantie gekeken naar beschikbare literatuur, maar indien niet beschikbaar zal gekozen worden voor gemixte groepen (mannelijk/vrouwelijk: 50/50) tenzij op voorhand bekend is dat de spreiding te groot wordt bij gebruik van verschillende geslachten.
- **Fretten:** fretten, mannelijk of vrouwelijk van 4-8 maanden oud.
Fretten zijn gevoelig voor infectie met wild-type klinische relevante influenza virussen en derhalve worden fretten bijvoorbeeld ook regelmatig gebruikt voor het genereren van anti-sera voor het typeren van influenza virussen. Daarnaast zijn de klinische verschijnselen geobserveerd in fretten overeenkomstig met de klinische verschijnselen in mensen. Voor deze experimenten zullen vrouwelijke of mannelijke dieren gebruikt worden en de keus voor een bepaald geslacht zal bepaald worden door de beschikbaarheid van de verschillende geslachten. De beschikbaarheid van een gevalideerd model is minder van toepassing in deze dierproeven aangezien binnen deze experimenten de verschillende groepen 1:1 vergeleken worden met elkaar. Daarnaast zijn de groepen dusdanig klein in deze experimenten, dat met dergelijke aantallen niet gewerkt kan worden met gemixte groepen van mannelijke en vrouwelijke dieren. Het gebruik van gemixte groepen zal altijd gepaard gaan met grotere aantallen en is niet wenselijk in het kader van vermindering.

Herkomst: geregistreerde proefdierfokker

- Fretten: Er is een jarenlange relatie met de betreffende fokker en in overleg met de aanvrager is een huisvestingsregime opgesteld dat de influenza-specifieke seronegativiteit van de dieren waarborgt. Dit laatste garandeert dat de dieren ook daadwerkelijk geïnfecteerd kunnen worden.

Geschatte aantal:

- Muizen: 1200 dieren in 5 jaar. Er wordt verwacht om een dergelijke studie 4 keer per jaar uit te voeren voor een bepaald virus (zie hieronder voor de rechtvaardiging van het aantal virussen) in twee verschillende doseringen met per dosering vier verschillende euthanasie momenten t.o.v. een positieve en een negatieve controle die beide een enkel euthanasie moment hebben, dus een totaal aantal van 4 studies x 10 groepen van 6 dieren x 5 jaar = 1200 dieren
- Fretten: 600 dieren in 5 jaar. Er wordt verwacht om een dergelijke studie 4 keer per jaar uit te

voeren voor een bepaald virus (zie hieronder voor de rechtvaardiging van het aantal virussen) in twee verschillende doseringen met per dosering vier verschillende euthanasie momenten t.o.v. een positieve en een negatieve controle die beide een enkel euthanasie moment hebben, dus een totaal aantal van 4 studies x 10 groepen van 3 dieren x 5 jaar = 600 dieren

Bij de berekening van de aantallen is rekening gehouden met het feit dat elk jaar 4 verschillende influenza virussen circuleren (2xA en 2xB) en deze vertegenwoordigd zijn in het vaccin. Effectiviteit dient dus uitgetest te worden tegen alle vier de circulerende virussen, vandaar dat een dergelijke studie 4 keer per jaar wordt uitgevoerd.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☐ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: deze experimenten zijn opgezet om te bepalen of de virus stock die geproduceerd is voor gebruik in de mens vergelijkbaar of minder pathogeen is dan het oorspronkelijke virus. Eerste resultaten zullen verkregen worden in vitro, waarbij bestudeerd wordt of het virus daadwerkelijk infectieus is (en dus kan repliceren in een gastheer) en of het een andere groei kinetiek vertoont. Indien het virus niet infectieus is, zal het niet uitgetest worden in een proefdier. Bij verhoogde groei kinetiek kan besloten worden om het in vivo experiment niet uit te voeren (GO/NO GO beslissing). Voor het bepalen van de pathogeniciteit en replicatie in de luchtwegen is het intacte dier benodigd en daarom is dit in vitro niet na te bootsen.

Vermindering: voorafgaand aan het in vivo experiment, zal het virus in vitro bestudeerd worden om te bepalen of de kinetiek van de virus stock afwijkt van het oorspronkelijke virus. Indien een verhoogde replicatie/pathogeniciteit (in vitro) geobserveerd wordt, kan besloten worden om de betreffende stock niet uit te testen in vivo. Bovengenoemde groepsgrootte is bepaald op basis van verwachtingen, echter indien al in vivo resultaten beschikbaar zijn voor het betreffende virus zal dit gebruikt worden voor een nieuwe power berekening. Deze zal in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD.

Verfijning: Meest invasieve behandelingen zullen uitgevoerd worden onder sedatie en dieren worden dagelijks geobserveerd. Indien de klinische symptomen daartoe aanleiding geven (vertonen van ademhalingsproblemen) zullen de dieren frequenter geobserveerd worden. Zo kan voorkomen worden dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment. Als er meerdere kandidaat influenza virussen zijn, zullen deze in eerste instantie het muizenmodel bestudeerd worden. Op basis van de resultaten in deze studies kan besloten worden om bepaalde influenza virussen wel (GO) of niet (NO GO) uit te testen in het frettenmodel. In het algemeen zullen alleen laag-pathogene virussen gebruikt worden in het humane challenge model, dit zal dus ook in het frettenmodel tot zeer beperkt ongerief leiden en aangezien deze virussen niet muis-geadapteerd zijn, zal het veroorzaakte ongerief ook beperkt zijn in het muizenmodel. Echter, tijdens de challenge fase kunnen klinische symptomen zeer snel tot uiting komen omdat de replicatie van influenza een logaritmische curve doormaakt. Zo kan bijvoorbeeld aan het eind van de dag besloten worden om laat op de avond nog een extra controle tijdstip in te voegen vanwege dierwelzijnsstandpunt om te voorkomen dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op

nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt worden door het feit dat de dieren gehuisvest zullen worden na infectie onder klasse II of klasse III inperking. Afval (bedding, kadavers en andere gebruikte materialen) zal aangeboden worden voor destructie.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t. Het betreffen hier experimenten die opgelegd zijn door regelgevende instanties (en dus een wettelijke vereiste zijn) en het virus / de virussen welke uitgetest zal / zullen worden zijn elke keer verschillend van origine.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Na de operatieve plaatsing van de temperatuur loggers bij fretten zullen de dieren peri- en post operatief pijnbestrijding krijgen (meloxicam). Als gevolg van de infectie en vervolgens replicatie van het virus in de luchtwegen, is de inschatting dat de dieren geen pijn zullen ondervinden.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Andere verschijnselen die de dieren kunnen vertonen, maar die niet gepaard gaan met pijn zijn:

- zijn algemene verschijnselen: gewichtsverlies en verminderd actief bij stimulatie
- respiratoire verschijnselen: een verhoogde ademhalingsfrequentie (deze zal bij verergering overgaan in stokkende/schokkende ademhaling)
- neurologische verschijnselen: verstoorde locomotie zoals een instabiele gang en/of ongecontroleerde bewegingen (deze zal bij verergering overgaan in verlamming (parese en paralyse)).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De klachten worden veroorzaakt door infectie met het influenza virus en vervolgens replicatie in de luchtwegen (respiratoire verschijnselen) of de hersenen (neurologische verschijnselen).

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

Behalve na implantatie van de temperatuur loggers in fretten, is de inschatting is dat de dieren binnen de studie geen pijn zullen ondervinden als gevolg van de infectie (zie ook H). Daarnaast is het zo dat de meest gangbare analgetica in het algemeen naast pijnstillende ook een ontstekingsremmende werking hebben en kunnen dus interfereren in de studie. Daarom is per definitie het gebruik van dergelijke analgetica niet mogelijk in deze experimenten vanwege verstoring van de primaire uitlees parameter.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Muizen:

De dieren zullen dagelijks geobserveerd worden en klinische scores worden genoteerd. Bij matig ongerief (zie hieronder de inschaling van de ongerief klassen) zal het betreffende dier uit de studie worden genomen. Deze klinische ongerief klassificaties zijn:

Licht: 2 algemene symptomen*

Matig: 3 algemene symptomen*

* algemene symptomen: opgezette vacht, gebogen postuur en verminderd actief

Fretten:

Tijdens de challenge fase kunnen infectie gerelateerde verschijnselen optreden welke leiden tot de volgende humane eindpunten. Bij het vertonen 1 van de volgende humane eindpunten (matig ongerief) zal het betreffende dier geëuthanaseerd worden:

1. Gewichtsverlies: na infectie worden de dieren dagelijks bemonsterd, waarbij ook de Body Score Index bepaald kan worden. Indien de dieren een voelbare vermagering hebben (ribben makkelijk palpabel), zullen ze vanuit welzijnsstandpunt dagelijks gewogen worden. Het humane eindpunt is gedefinieerd als het betreffende dier >10% gewicht verliest (geclassificeerd als matig ongerief) t.o.v. het startgewicht op de dag van challenge.
2. Respiratie: bij verergering van de ziekte zal de ademhaling veranderen van normale naar een verhoogde ademhalingsfrequentie (licht ongerief). Bij verergering van de symptomen naar stokkende / schokkende ademhaling zal het dier geëuthanaseerd worden (matig ongerief).
3. Diarree: indien in de huisvesting te zien is dat een of meerdere dieren diarree (geclassificeerd als matig) hebben, zullen alle dieren afzonderlijk beoordeeld worden om te bepalen of er aanwijzingen zijn (vuile vacht rond de anus) welke dieren daadwerkelijk diarree vertonen.

Muizen/Fretten:

Bij de volgende verschijnselen zullen de dieren direct geëuthanaseerd worden (beide geclassificeerd als

ernstig ongerief). Zoals hieronder ook aangegeven is de kans op deze verschijnselen zeer klein en derhalve zijn deze ook niet meegenomen in het cumulatieve ongerief bij punt K.

1. Neurologisch: in enkele gevallen kan het virus vanuit de neus van het dier doorslaan naar de hersenen en zo een ontsteking van de hersenen induceren. De daarbij behorende verschijnselen zijn onstabiele gang en ongecontroleerde bewegingen (zoals beschreven in Bodewes et al 2015 AJP).

Lethargie: indien een dier lethargisch is (m.a.w. als het niet meer reageert op externe prikkels).

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

100% van alle dieren zullen licht ongerief vertonen als gevolg van de infectie met influenza virus en daarnaast zullen de fretten matig ongerief hebben als gevolg van de (herhaalde) handelingen. De verwachting is dat meer dan licht ongerief als gevolg van de infectie niet zal voorkomen (<5%) aangezien in het algemeen influenza virussen welke bedoeld zijn voor humane challenge alleen milde verschijnselen zullen vertonen en daarnaast zijn dit geen virussen welke geadapteerd zijn aan de muis, die na muis-adaptie meer pathogeen zijn dan het wild-type virus.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Het cumulatieve ongerief voor deze experimenten wordt ingeschaald op licht voor de muizen als gevolg van de infectie en matig voor de fretten als gevolg van de infectie en (herhaalde) handelingen.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Om te controleren of het virus repliceert in de longen en wat de pathologische schade is in de longen, worden deze verwijderd en verder verwerkt voor onderzoek. Dit is niet mogelijk bij in leven laten van het dier.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	90500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	2	Veiligheid van respiratoir syncytieel virus voor humaan gebruik

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Voor het onderzoek naar respiratoir syncytieel virus (RSV) is het ook mogelijk om gebruik te maken van gezonde vrijwilligers in plaats van proefdieren. Om de veiligheid van deze vrijwilligers te waarborgen is het van belang dat de virussen waarmee ze worden geïnfecteerd van te voren worden getest op virulentie en pathogeniciteit. Bij de productie van een virus stock voor gebruik in de mens wordt het betreffende virus in vitro opgegroeid. Om te kunnen garanderen dat het virus dat de mens in gaat nog steeds het zelfde fenotype heeft, zal deze eerst in dieren getest moeten. Dergelijke vereisten zijn in het algemeen omschreven in de Pharmacopeia, vertaald door Memoli et al (Clinical Infectious Diseases 2015, Appendix 1) en toegepast in de genoemde publicatie voor wat betreft het uittesten van influenza virus in muizen. Dergelijke studies voor het uittesten van RSV zijn nog niet eerder beschreven in de literatuur en derhalve zijn de studies zoals beschreven in dierproef 1 als richtlijn gebruikt voor het uittesten van RSV in de relevante diermodellen. Voor RSV zijn verschillende diermodellen beschikbaar. Het kleinst mogelijke model is de katoenrat en dit model kan goed gebruikt worden om de virus replicatie te bestuderen in de longen. Dit model kan beschouwd worden als een eerste keuze model, waarna voor een meer klinisch relevant model gekozen kan worden voor een kandidaat virus voor humaan gebruik. Indien meerdere kandidaat virus stocks beschikbaar zijn kan in het katoenrattenmodel een eerste selectie gemaakt worden op basis van virulentie. Virus stocks die meer virulentie vertonen dan de controle (het oorspronkelijke virus of de meegenomen relevante positieve controle), zullen uitgesloten worden voor humaan gebruik en dus niet verder getest worden in het frettenmodel (NO GO). Kandidaat virus stock(s) die verminderde of gelijke virulentie vertonen in vergelijking met de controle kan (kunnen) vervolgens uitgetest worden in het frettenmodel (GO). Dit frettenmodel is een meer relevant model, waarbij het ziekteverloop en de uiteindelijke pathologie vergelijkbaar is met de mens. Resultaten verkregen in het frettenmodel zijn leidend voor de veiligheid in de mens en bij verminderde of gelijke pathologie in vergelijking met de controle kan de

betreffende virus stock vrijgegeven worden voor gebruik in de mens (GO). Bij verhoogde pathologie in vergelijking met de controle zal het betreffende virus alsnog gediskwalificeerd worden voor gebruik in de mens (NO GO).

Zoals hierboven genoemd is de primaire uitkomst parameter in deze experimenten afhankelijk van het gekozen diermodel. Deze is voor de verschillende modellen:

- Katoenratten: virus replicatie in de longen (virulentie)

Fretten: long pathologie (pathogeniciteit)

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Katoenratten:

Nadat de dieren zijn aangekomen binnen de faciliteit zullen ze een acclimatisatie periode hebben van minimaal 1 week. Dieren worden voor de proef gewogen, geïdentificeerd door middel van oorknip en er wordt bloed afgenomen via de wangprik (~100ul) voor serum (het zogenaamde nul-monster). Deze hoeveelheid serum (~50ul) is voldoende om in het geval van onverwachte resultaten op basis van serologie uit te sluiten dat de dieren op voorhand een immunologische respons hadden die van invloed zou kunnen zijn op de infectie. Daarnaast zal dit nul-monster ook dienen als referentie in de serologische analyses. Nadat de dieren zijn gesedeerd (isofluraan 3-4%), worden de dieren intranasaal (50µL) geïnoculeerd. Op een aantal vroege tijdstippen na inoculatie worden een aantal dieren van iedere groep geëuthanaseerd, waarna de longen worden verzameld. Deze vroege tijdstippen zijn gekozen om tijdens de log-fase van de virus replicatie te bestuderen of er verschillen zijn tussen de verschillende doseringen/virussen op basis van virulentie en pathologie. Het tijdstip van dit vroege moment zal afhangen van het betreffende virus en zal bepaald worden op basis van reeds beschikbare data of via literatuur onderzoek. De overgebleven dieren worden aan het einde van het experiment (dag 14) geëuthanaseerd en ook hier worden de longen verzameld voor virologie en pathologie. Dit late tijdstip is gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. Het eerste (verlengde uitscheiding van het virus) zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus. Tijdens de gehele studie worden de dieren dagelijks gewogen en wordt er gekeken naar klinische verschijnselen. Daarnaast zullen dieren vroegtijdig uit de studie worden gehaald indien het humane eindpunt wordt bereikt. Hieronder is een voorbeeld van een dergelijke studie waarin een bepaald(e) RSV dosis (doses) getest wordt in katoenratten. Daarnaast zal in een dergelijke studie een negatieve en een positieve controle meegenomen worden. De positieve controle dient om de vergelijking te maken met het uit te testen virus en de negatieve controle als nul-referentie ten opzichte van de geïnfecteerde dieren. Voor beide controles zal het tijdstip van euthanasie beschreven en beargumenteerd worden in het werkprotocol.

		Infection phase																
Group	No/Group	d -7																
			d -1	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14
1	6	entry of animals in the preclinical facility	C,W, B	Intranasal Administration of RSV, C, W	C,W	C,W	C, B, W, Euthanasia, T											
2	6						C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T									
3	6						C, W	C, W	C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T							
4	6						C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T
HOUSING		DM-II	DM-II															

* W = body weight, B = blood for serum, C = clinical scoring, T = tissue;

* W = body weight, B = blood for serum, C = clinical scoring, T = tissue;

Fretten:

Nadat de dieren zijn aangekomen binnen de faciliteit zullen ze een acclimatisatie periode hebben van minimaal 1 week. Minimaal 14 dagen voor de start van het experiment zal een zgn. nul-bloedmonster voor referentie in analyses afgenomen worden onder sedatie via de vena jugularis. Dit serum zal gebruikt worden om in het geval van onverwachte resultaten op basis van serologie uit te sluiten dat de dieren op voorhand een immunologische respons hadden die van invloed zou kunnen zijn op de infectie. Daarnaast zal dit nul-monster ook dienen als referentie in de serologische analyses. Hierna zal een datalogger ingebracht worden.

Dit zal gebeuren door middel van een operatie waarbij de buikwand geopend zal worden en de temperatuurlogger via de linea alba in de peritoneale holte geplaatst zal worden waarna de wond gehecht wordt. Deze datalogger meet de lichaamstemperatuur en/of activiteit van het dier gedurende de looptijd van de studie (klinische parameter). Peri- en postoperatief zullen de dieren topicale pijnbestrijding krijgen om het genezingsproces te bevorderen en na afloop van de operatie zal de werking van de anesthesie geantagoneerd worden. Deze dataloggers worden gebruikt aangezien fretten (zeker bij milde infecties) klinisch niet duidelijk te scoren zijn ondanks het feit dat in de pathologie (zowel gross als microscopisch) wel degelijk veranderingen te zien zijn. De aldus verkregen data (temperatuur en/of activiteit) dragen bij het analyseren van het model, primaire en secundaire uitleesparameters. Op dag -1 zullen alle dieren gewogen en bemonsterd (neus en keel) worden en op dag 0 via de intranasale route geïnoculeerd worden met een volume van 300ul. Het nul-monster wordt een dag voor de daadwerkelijke inoculatie uitgevoerd om geen interferentie te hebben met de inoculatie zelf. Aangezien hier een uitspraak gedaan zal worden over de veiligheid in gebruik bij de mens, wordt ook de route identiek gehouden (ter vergelijking: een dergelijk challenge in mensen wordt ook via de intranasale route gegeven). Na infectie zal de anesthesie geantagoneerd worden en zullen de dieren dagelijks bemonsterd worden uit de bovenste luchtwegen (keel en neus) onder anesthesie en zal de Body Score Index bepaald worden. Bij makkelijk palpabele ribben zal besloten worden om vanuit welzijnsstandpunt de dieren te wegen tijdens hetzelfde anesthesie moment. Op gezette tijden na infectie (of eerder indien een dier het humane eindpunt bereikt) zullen dieren geëuthanaseerd worden voor het verzamelen van relevant weefsel. De overgebleven dieren worden aan het einde van het experiment (dag 14) geëuthanaseerd en ook hier worden de longen verzameld. Dit late tijdstip is gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. Het eerste (verlengde uitscheiding van het virus) zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus. Daarnaast zullen de dieren dagelijks tot het einde van de proef geobserveerd worden om te bepalen of er klinische verschijnselen te zien zijn. Hieronder is een voorbeeld van een dergelijke studie waarin twee verschillende (doses van) RSV getest wordt in fretten in vergelijking met een positieve en een negatieve controle. De route van de negatieve dan wel positieve controle kan afwijken van de route voor de uit te testen virus stock (bijvoorbeeld intratracheaal of zowel intratracheaal als intranasaal), dit zal op geleide van historische gegevens gaan en zal beargumenteerd worden in het werkprotocol.

		Preparation*		Challenge & Sampling**																	
Group	No/Group	d -21	d -14**	d -1	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14		
1	3	entry of animals into the preclinical facility	W	Implantation data logger, B*	C, S, W	C, S	C, S	Negative control												C, B, S, Euthanasia, T	
2	3							C, S, Euthanasia, T													
3	3							C, S	C, S	C, S, Euthanasia, T											
4	3							C, S	C, S	C, S	C	C, B, S, Euthanasia, T									
5	3							C, S	C, S	C, S	C	C, S	C	C	C, S	C	C	C	C	C, B, S, Euthanasia, T	
6	3							C, S, Euthanasia, T													
7	3							C, S	C, S	C, S, Euthanasia, T											
8	3							C, S	C, S	C, S	C	C, B, S, Euthanasia, T									
9	3							C, S	C, S	C, S	C	C, S	C	C	C, S	C	C	C	C	C, B, S, Euthanasia, T	
10	3							C, S	C, S	C, S, Euthanasia, T											
HOUSING		DM-I/II		DM-II/isolator																	

Animals seronegative for RSV and Aleutian Disease will be brought into the animal facility
* S = nose & throat swabs, B = blood for serum, C = clinical scoring, W = body weight, T = tissue;
** all animals will be implanted with a pre-programmed data logger.

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

Katoenratten:

Aangezien het hier nieuwe RSV isolaten betreffen welke nog niet uitgetest zijn in het katoenratten model is nog geen spreiding van de resultaten bekend op het gebied van virale load in de longen (primaire uitleesparameter in het katoenrattenmodel). Er kan dus geen exacte statistische berekening gedaan worden over de groepsgrootte. Als er gekeken wordt naar de publicatie van Overbaugh en Richardson (J. Virology

2005) is gekozen voor een groepsgrootte per euthanasie moment van 6 dieren, bij deze groepsgrootte zal een outlier binnen een groep geen invloed hebben op de significantie. Indien reeds data beschikbaar is van het betreffende wild-type virus, kan dit wel gebruikt worden voor een power berekening en zal dit in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD. Naar analogie met influenza in muizen is wel al beschreven dat met deze aantallen dieren een significante uitspraak gedaan kan worden over de replicatie kinetiek van het opgegroeide virus voor humaan gebruik in vergelijking met het oorspronkelijke virus in muizen (Memoli et al Clinical Infectious Diseases 2015).

Fretten:

Aangezien het hier nieuwe RSV isolaten betreffen welke nog niet uitgetest zijn in het fretten model is nog geen spreiding van de resultaten bekend op het gebied van de pathologie (primaire uitleesparameter in het frettenmodel). Er kan dus geen exacte statistische berekening gedaan worden over de groepsgrootte. Per euthanasie moment zullen drie dieren gebruikt worden. Aangezien in dit experiment de verschillende groepen met elkaar vergeleken kunnen worden, is het mogelijk om de experimenten met een dergelijk laag aantal dieren per groep uit te voeren. Eerdere vergelijkbare experimenten (dose-finding van influenza virussen in fretten) hebben laten zien dat met dergelijke kleine groepen een goed onderbouwde keuze gemaakt kan worden over de dosis van het betreffende virus. De verwachting is dat in deze experimenten dergelijke aantallen ook voldoende zijn om te komen tot een gedegen uitspraak in de resultaten. Daarnaast is het zo dat in tegenstelling tot de muizen, in de fretten andere uitleesparameters (secundaire uitleesparameters) beschikbaar zijn naast de primaire uitleesparameter. Deze secundaire uitleesparameters zullen ervoor zorgen dat met kleinere groepen significante verschillen aangetoond kunnen worden tussen de groepen. Indien reeds data beschikbaar is van het betreffende wild-type virus, kan dit wel gebruikt worden voor een power berekening en zal dit in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD.

B. De dieren

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

Diersoort:

- **Katoenratten:** vrouwelijk en/of mannelijk van 6-8 weken oud.
Reeds gepubliceerd en eerder door de aanvragen uitgevoerd onderzoek heeft aangetoond dat katoenratten gevoelig zijn voor infectie met RSV. De eerste studie welke uitgevoerd wordt binnen deze aanvraag zal uitgevoerd worden met gemixte groepen. De resultaten verkregen in dit experiment zullen leidend zijn voor de keus van geslacht in vervolg experimenten.
- **Fretten:** fretten, mannelijk of vrouwelijk van 4-8 maanden oud.
Fretten zijn gevoelig voor infectie met wild-type RSV isolaten (eigen uitgevoerd onderzoek). De klinische verschijnselen geobserveerd in fretten zijn overeenkomstig met de klinische verschijnselen in mensen. Voor deze experimenten zullen vrouwelijke of mannelijke dieren gebruikt worden en de keus voor een bepaald geslacht zal bepaald worden door de beschikbaarheid van de verschillende geslachten. De beschikbaarheid van een gevalideerd model is minder van toepassing in deze dierproeven aangezien binnen deze experimenten de verschillende groepen 1:1 vergeleken worden met elkaar. Daarnaast zijn de groepen dusdanig klein in deze experimenten, dat met dergelijke aantallen niet gewerkt kan worden met gemixte groepen van mannelijke en vrouwelijke dieren. Het gebruik van gemixte groepen zal altijd gepaard gaan met grotere aantallen en is niet wenselijk in het kader van vermindering.

Herkomst: geregistreerde proefdierfokker

- Fretten: Er is een jarenlange relatie met de betreffende fokker en in overleg met de aanvrager is een huisvestingsregime opgesteld dat de RSV-specifieke seronegativiteit van de dieren waarborgt. Dit laatste garandeert dat de dieren ook daadwerkelijk geïnfecteerd kunnen worden.

Geschatte aantal:

- Katoenratten: 600 dieren in 5 jaar. Er wordt verwacht om een dergelijke studie 2 keer per jaar uit te voeren voor een bepaald virus (zie hieronder voor de rechtvaardiging van het aantal virussen) in twee verschillende doseringen met per dosering vier verschillende euthanasie momenten t.o.v. een positieve en een negatieve controle die beide een enkel euthanasie moment hebben, dus een totaal aantal van 2 studies x 10 groepen van 6 dieren x 5 jaar = 600 dieren
- Fretten: 300 dieren in 5 jaar. Er wordt verwacht om een dergelijke studie 2 keer per jaar uit te voeren voor een bepaald virus (zie hieronder voor de rechtvaardiging van het aantal virussen) in

twee verschillende doseringen met per dosering vier verschillende euthanasie momenten t.o.v. een positieve en een negatieve controle die beide een enkel euthanasie moment hebben, dus een totaal aantal van 2 studies x 10 groepen van 3 dieren x 5 jaar = 300 dieren

Bij de berekening van de aantallen is rekening gehouden met het feit dat elk jaar 2 verschillende RSV virussen circuleren (1xA en 1xB). Effectiviteit dient dus uitgetest te worden tegen allebei de circulerende virussen, vandaar dat een dergelijke studie 2 keer per jaar wordt uitgevoerd.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☐ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: deze experimenten zijn opgezet om te bepalen of de virus stock die geproduceerd is voor gebruik in de mens vergelijkbaar of minder pathogeen is dan het oorspronkelijke virus. Eerste resultaten zullen verkregen worden in vitro, waarbij bestudeerd wordt of het virus daadwerkelijk infectieus is (en dus kan repliceren in een gastheer) en of het een andere groei kinetiek vertoont. Indien het virus niet infectieus is, zal het niet uitgetest worden in een proefdier. Bij verhoogde groei kinetiek kan besloten worden om het in vivo experiment niet uit te voeren (GO/NO GO beslissing). Voor het bepalen van de pathogeniciteit en replicatie in de luchtwegen is het intacte dier benodigd en daarom is dit in vitro niet na te bootsen.

Vermindering: voorafgaand aan het in vivo experiment, zal het virus in vitro bestudeerd worden om te bepalen of de kinetiek van de virus stock afwijkt van het oorspronkelijke virus. Indien een verhoogde replicatie/pathogeniciteit (in vitro) geobserveerd wordt, kan besloten worden om de betreffende stock niet uit te testen in vivo. Bovengenoemde groepsgrootte is bepaald op basis van verwachtingen, echter indien al in vivo resultaten beschikbaar zijn voor het betreffende virus zal dit gebruikt worden voor een nieuwe power berekening. Deze zal in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD.

Verfijning: Meest invasieve behandelingen zullen uitgevoerd worden onder sedatie en dieren worden dagelijks geobserveerd. Indien de klinische symptomen daartoe aanleiding geven (vertonen van ademhalingsproblemen) zullen de dieren frequenter geobserveerd worden. Zo kan voorkomen worden dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment. Als er meerdere kandidaat RSV virussen zijn, zullen deze in eerste instantie het katoenrattenmodel bestudeerd worden. Op basis van de resultaten in deze studies kan besloten worden om bepaalde RSV virussen wel (GO) of niet (NO GO) uit te testen in het frettenmodel. In het algemeen is RSV een laag-pathogeen virus, daarom zal het veroorzaakte ongerief ook beperkt zijn in beide modellen. Echter, tijdens de challenge fase kunnen klinische symptomen zeer snel tot uiting komen omdat de replicatie van RSV een logaritmische curve doormaakt. Zo kan bijvoorbeeld aan het eind van de dag besloten worden om laat op de avond nog een extra controle tijdstip in te voegen vanwege dierwelzijnsstandpunt om te voorkomen dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt worden door het feit dat de dieren gehuisvest zullen worden na infectie onder klasse II of klasse III inperking. Afval (bedding, kadavers en andere gebruikte materialen) zal aangeboden worden voor destructie.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t. Het betreffen hier experimenten die opgelegd zijn door regelgevende instanties (en dus een wettelijke vereiste zijn) en het virus / de virussen welke uitgetest zal / zullen worden zijn elke keer verschillend van origine.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Na de operatieve plaatsing van de temperatuur loggers bij fretten zullen de dieren peri- en post operatief pijnbestrijding krijgen (meloxicam). Als gevolg van de infectie en vervolgens replicatie van het virus in de luchtwegen, is de inschatting dat de dieren geen pijn zullen ondervinden.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Andere verschijnselen die de dieren kunnen vertonen, maar die niet gepaard gaan met pijn zijn:

- zijn algemene verschijnselen: gewichtsverlies en verminderd actief bij stimulatie

- respiratoire verschijnselen: een verhoogde ademhalingsfrequentie (deze zal bij verergering overgaan in stokkende/schokkende ademhaling)

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De klachten worden veroorzaakt door infectie met RSV en vervolgens replicatie in de luchtwegen (respiratoire verschijnselen).

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

Behalve na implantatie van de temperatuur loggers in fretten, is de inschatting is dat de dieren binnen de studie geen pijn zullen ondervinden als gevolg van de infectie (zie ook H). Daarnaast is het zo dat de meest gangbare analgetica in het algemeen naast pijnstillende ook een ontstekingsremmende werking hebben en kunnen dus interfereren in de studie. Daarom is per definitie het gebruik van dergelijke analgetica niet mogelijk in deze experimenten vanwege verstoring van de primaire uitlees parameter.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Katoenratten:

De dieren zullen dagelijks geobserveerd worden en klinische scores worden genoteerd. Bij matig ongerief (zie hieronder de inschaling van de ongerief klassen) zal het betreffende dier uit de studie worden genomen. Deze klinische ongerief klassificaties zijn:

Licht: 2 algemene symptomen*

Matig: 3 algemene symptomen*

* algemene symptomen: opgezette vacht, gebogen postuur en verminderd actief

Fretten:

Tijdens de challenge fase kunnen infectie gerelateerde verschijnselen optreden welke leiden tot de volgende humane eindpunten. Bij het vertonen 1 van de volgende humane eindpunten (matig ongerief) zal het betreffende dier geëuthanaseerd worden:

1. Gewichtsverlies: na infectie worden de dieren dagelijks bemonsterd, waarbij ook de Body Score Index bepaald kan worden. Indien de dieren een voelbare vermagering hebben (ribben makkelijk palpabel), zullen ze vanuit welzijnsstandpunt dagelijks gewogen worden. Het humane eindpunt is gedefinieerd als het betreffende dier >10% gewicht verliest (geclassificeerd als matig ongerief) t.o.v. het startgewicht op de dag van challenge.
2. Respiratie: bij verergering van de ziekte zal de ademhaling veranderen van normale naar een verhoogde ademhalingsfrequentie (licht ongerief). Bij verergering van de symptomen naar stokkende / schokkende ademhaling zal het dier geëuthanaseerd worden (matig ongerief).

Katoenratten/Fretten:

Bij de volgende verschijnselen zullen de dieren direct geëuthanaseerd worden (geclassificeerd als ernstig ongerief). Zoals hieronder ook aangegeven is de kans op deze verschijnselen zeer klein en derhalve zijn deze ook niet meegenomen in het cumulatieve ongerief bij punt K. Lethargie: indien een dier lethargisch is (m.a.w. als het niet meer reageert op externe prikkels).

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

100% van alle dieren zullen licht ongerief vertonen als gevolg van de infectie met RSV en daarnaast zullen de fretten matig ongerief hebben als gevolg van de (herhaalde) handelingen. De verwachting is dat meer dan licht ongerief als gevolg van de infectie niet zal voorkomen (<5%) aangezien in het algemeen RSV alleen milde infectie zal induceren in katoenratten en fretten.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Het cumulatieve ongerief voor deze experimenten wordt ingeschaald op licht voor de katoenratten als gevolg van de infectie en matig voor de fretten als gevolg van de infectie en (herhaalde) handelingen.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Om te controleren of het virus repliceert in de longen en wat de pathologische schade is in de longen, worden deze verwijderd en verder verwerkt voor onderzoek. Dit is niet mogelijk bij in leven laten van het dier.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	90500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		3	Veiligheid van rhinovirus voor humaan gebruik

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Voor het onderzoek naar rhinovirus is het ook mogelijk om gebruik te maken van gezonde vrijwilligers in plaats van proefdieren. Om de veiligheid van deze vrijwilligers te waarborgen is het van belang dat het virus waarmee ze worden geïnfecteerd van te voren worden getest op virulentie en pathogeniciteit. Bij de productie van een virus stock voor gebruik in de mens wordt het betreffende virus in vitro opgegroeid. Om te kunnen garanderen dat het virus dat de mens in gaat nog steeds het zelfde fenotype heeft, zal deze eerst in dieren getest moeten. Dergelijke vereisten zijn in het algemeen omschreven in de Pharmacopeia, vertaald door Memoli et al (Clinical Infectious Diseases 2015, Appendix 1) en toegepast in de genoemde publicatie voor wat betreft het uittesten van influenza virus in muizen. Dergelijke studies voor het uittesten van rhinovirus zijn nog niet eerder beschreven in de literatuur en derhalve zijn de studies zoals beschreven in dierproef 1 als richtlijn gebruikt voor het uittesten van rhinovirus in het relevante diervorm. Voor rhinovirus is vooralsnog maar één diervorm beschikbaar, namelijk de katoenrat. Dit model kan goed gebruikt worden om de virus replicatie te bestuderen in de longen. Virus stocks die meer virulentie vertonen dan de controle (het oorspronkelijke virus of de meegenomen relevante positieve controle), zullen uitgesloten worden voor humaan gebruik (NO GO). Virus stock(s) die verminderde of gelijke virulentie vertonen in vergelijking met de controle kunnen vrijgegeven worden voor gebruik in de mens (GO).

De primaire uitkomst parameter in deze experimenten is: virus replicatie in de longen (virulentie).

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Katoenratten:

Nadat de dieren zijn aangekomen binnen de faciliteit zullen ze een acclimatisatie periode hebben van minimaal 1 week. Dieren worden voor de proef gewogen, geïdentificeerd door middel van oorknip en er wordt bloed afgenomen via de wangprik (~100ul) voor serum (het zogenaamde nul-monster). Deze

hoeveelheid serum (~50ul) is voldoende om in het geval van onverwachte resultaten op basis van serologie uit te sluiten dat de dieren op voorhand een immunologische respons hadden die van invloed zou kunnen zijn op de infectie. Daarnaast zal dit nul-monster ook dienen als referentie in de serologische analyses. Nadat de dieren zijn gesedeerd (isofluraan 3-4%), worden de dieren intranasaal (50µL) geïnoculeerd. Op een aantal vroege tijdstippen na inoculatie worden een aantal dieren van iedere groep geëuthanaseerd, waarna de longen worden verzameld. Deze vroege tijdstippen zijn gekozen om tijdens de log-fase van de virus replicatie te bestuderen of er verschillen zijn tussen de verschillende doseringen/virussen op basis van virulentie en pathologie. De overgebleven dieren worden aan het einde van het experiment (dag 14) geëuthanaseerd en ook hier worden de longen verzameld voor virologie en pathologie. Dit late tijdstip is gekozen om te bestuderen of een bepaald virus verlengde replicatie vertoont na infectie en of de dieren zijn geseroconverteerd. Het eerste (verlengde uitscheiding van het virus) zou ook kunnen duiden op een veranderd fenotype van het virus. Tijdens de gehele studie worden de dieren dagelijks gewogen en wordt er gekeken naar klinische verschijnselen. Daarnaast zullen dieren vroegtijdig uit de studie worden gehaald indien het humane eindpunt wordt bereikt. Hieronder is een voorbeeld van een dergelijke studie waarin een bepaald(e) rhinovirus dosis (doses) getest wordt in katoenratten. Daarnaast zal in een dergelijke studie een negatieve en een positieve controle meegenomen worden. De positieve controle dient om de vergelijking te maken met het uit te testen virus en de negatieve controle als nul-referentie ten opzichte van de geïnfecteerde dieren. Voor beide controles zal het tijdstip van euthanasie beschreven en beargumenteerd worden in het werkprotocol.

		Infection phase																							
Group	No/Group	d -7																							
			d -1	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14							
1	6	entry of animals in the preclinical facility	C,W, B	Intranasal Administration of RSV, C, W	C,W	C,W	C, B, W, Euthanasia, T																		
2	6						C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T																
3	6						C, W	C, W	C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T														
4	6						C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, W	C, B, W, Euthanasia, T				
HOUSING		DM-II	DM-II																						

* W = body weight, B = blood for serum, C = clinical scoring, T = tissue;

* W = body weight, B = blood for serum, C = clinical scoring, T = tissue;

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

Aangezien het hier nieuw opgegroeide rhinovirussen betreffen welke nog niet uitgetest zijn in het katoenratten model is nog geen spreiding van de resultaten bekend op het gebied van virale load in de longen (primaire uitleesparameter in het katoenrattenmodel). Er kan dus geen exacte statistische berekening gedaan worden over de groeps grootte. Als er gekeken wordt naar de publicatie van Overbaugh en Richardson (J. Virology 2005) is gekozen voor een groeps grootte per euthanasie moment van 6 dieren, bij deze groeps grootte zal een outlier binnen een groep geen invloed hebben op de significantie. Indien reeds data beschikbaar is van het betreffende wild-type virus, kan dit wel gebruikt worden voor een gedegen power berekening en zal dit in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD. Naar analogie met influenza in muizen is wel al beschreven dat met deze aantallen dieren een significante uitspraak gedaan kan worden over de replicatie kinetiek van het opgegroeide virus voor humaan gebruik in vergelijking met het oorspronkelijke virus in muizen (Memoli et al Clinical Infectious Diseases 2015).

B. De dieren

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

Diersoort:

- **Katoenratten:** vrouwelijk of mannelijk van 6-8 weken oud.
Reeds gepubliceerd onderzoek heeft aangetoond dat katoenratten gevoelig zijn voor infectie met rhinovirus. De eerste studie welke uitgevoerd wordt binnen deze aanvraag zal uitgevoerd worden met gemixte groepen. De resultaten verkregen in deze eerste studie zullen leidend zijn voor de keus

van geslacht in vervolg experimenten.

Herkomst: geregistreerde proefdierfokker

Geschatte aantal:

- Katoenratten: 300 dieren in 5 jaar. Er wordt verwacht om een dergelijke studie 1 keer per jaar uit te voeren voor een bepaald virus (zie hieronder voor de rechtvaardiging van dit aantal) in twee verschillende doseringen met per dosering vier verschillende euthanasie momenten t.o.v. een positieve en een negatieve controle die beide een enkel euthanasie moment hebben, dus een totaal aantal van 1 studie x 10 groepen van 6 dieren x 5 jaar = 300 dieren.

In tegenstelling tot de virussen benoemd in bijlage 1 (influenza) en 2 (RSV) is er voor rhinovirus maar 1 type beschikbaar dat gebruikt kan worden in het humane challenge model.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☐ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: deze experimenten zijn opgezet om te bepalen of de virus stock die geproduceerd is voor gebruik in de mens vergelijkbaar of minder pathogeen is dan het oorspronkelijke virus. Eerste resultaten zullen verkregen worden in vitro, waarbij bestudeerd wordt of het virus daadwerkelijk infectieus is (en dus kan repliceren in een gastheer) en of het een andere groei kinetiek vertoont. Indien het virus niet infectieus is, zal het niet uitgetest worden in een proefdier. Bij verhoogde groei kinetiek kan besloten worden om het in vivo experiment niet uit te voeren (GO/NO GO beslissing). Voor het bepalen van de replicatie in de luchtwegen is het intacte dier benodigd en daarom is dit in vitro niet na te bootsen.

Vermindering: voorafgaand aan het in vivo experiment, zal het virus in vitro bestudeerd worden om te bepalen of de kinetiek van de virus stock afwijkt van het oorspronkelijke virus. Indien een verhoogde replicatie/pathogeniciteit (in vitro) geobserveerd wordt, kan besloten worden om de betreffende stock niet uit te testen in vivo. Bovengenoemde groepsgrootte is bepaald op basis van verwachtingen, echter indien al in vivo resultaten beschikbaar zijn voor het betreffende virus zal dit gebruikt worden voor een nieuwe power berekening. Deze zal in het werkprotocol voorgelegd worden aan de IvD.

Verfijning: Meest invasieve behandelingen zullen uitgevoerd worden onder sedatie en dieren worden dagelijks geobserveerd. Indien de klinische symptomen daartoe aanleiding geven (vertonen van ademhalingsproblemen) zullen de dieren frequenter geobserveerd worden. Zo kan voorkomen worden dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment. In het algemeen is rhinovirus een laag-pathogeen virus, daarom zal het veroorzaakte ongerief ook beperkt zijn. Echter, tijdens de challenge fase kunnen klinische symptomen zeer snel tot uiting komen omdat de replicatie van rhinovirus een logaritmische curve doormaakt. Zo kan bijvoorbeeld aan het eind van de dag besloten worden om laat op de avond nog een extra controle tijdstip in te voegen vanwege dierwelzijnsstandpunt om te voorkomen dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt worden door het feit dat de dieren gehuisvest zullen worden na infectie onder klasse II of klasse III inperking. Afval (bedding, kadavers en andere gebruikte materialen) zal aangeboden worden voor destructie.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t. Het betreffen hier experimenten betreffen die opgelegd zijn door regelgevende instanties (en dus een wettelijke vereiste zijn) en het virus welke uitgetest wordt zal elke keer verschillend zijn van origine.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Andere verschijnselen die de dieren kunnen vertonen, maar die niet gepaard gaan met pijn zijn:

- zijn algemene verschijnselen: gewichtsverlies en verminderd actief bij stimulatie
- respiratoire verschijnselen: een verhoogde ademhalingsfrequentie (deze zal bij verergering overgaan in stokkende/schokkende ademhaling)

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De klachten worden veroorzaakt door infectie met rhinovirus en vervolgens replicatie in de luchtwegen (respiratoire verschijnselen).

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

De inschatting is dat de dieren binnen de studie geen pijn zullen ondervinden als gevolg van de infectie. Daarnaast is het zo dat de meest gangbare analgetica in het algemeen naast pijnstillende ook een ontstekingsremmende werking hebben en kunnen dus interfereren in de studie. Daarom is per definitie het gebruik van dergelijke analgetica niet mogelijk in deze experimenten vanwege verstoring van de primaire uitlees parameter.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De dieren zullen dagelijks geobserveerd worden en klinische scores worden genoteerd. Bij matig ongerief (zie hieronder de inschaling van de ongerief klassen) zal het betreffende dier uit de studie worden genomen. Deze klinische ongerief klassificaties zijn:

Licht: 2 algemene symptomen*

Matig: 3 algemene symptomen*

* algemene symptomen: opgezette vacht, gebogen postuur en verminderd actief

Bij de volgende verschijnselen zullen de dieren direct geëuthanaseerd worden (geclassificeerd als ernstig ongerief). Zoals hieronder ook aangegeven is de kans op deze verschijnselen zeer klein en derhalve zijn deze ook niet meegenomen in het cumulatieve ongerief bij punt K.

1. Lethargie: indien een dier lethargisch is (m.a.w. als het niet meer reageert op externe prikkels).

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

100% van de dieren zullen licht ongerief vertonen als gevolg van de infectie met rhinovirus. De verwachting is dat meer dan licht ongerief niet zal voorkomen (<5%) aangezien in het algemeen rhinovirus alleen milde infectie zal induceren in katoenratten.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Het cumulatieve ongerief voor deze experimenten wordt ingeschaald op licht.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Om te controleren of het virus repliceert in de longen en wat de pathologische schade is in de longen, worden deze verwijderd en verder verwerkt voor onderzoek. Dit is niet mogelijk bij in leven laten van het dier.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja

**Centrale Commissie Dierproeven**

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

Nistelrooise Baan 3
5347 RE SCHAIJK

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD905002016413

Uw referentie

Bijlagen
1

Datum 8 juni 2016

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 30 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Uittesten van veiligheid van respiratoire humane challenge virussen in verschillende proefdier modellen" met aanvraagnummer AVD905002016413. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 24 mei 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft de documenten van de projectaanvraag op ons verzoek opnieuw opgestuurd. Dit omdat uit het advies van de DEC volgt dat de aanvraag op basis van correspondentie met de DEC is aangepast.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden en het voorschrift zoals genoemd in de vergunning. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. In de bijlagen 3.4.4.2 en 3.4.4.3 beschrijft u dat u voor de katoenratten een eerste experiment met beide geslachten uitvoert. Op basis van de uitkomsten van deze eerste experimenten komt u tot de conclusie welk geslacht, of welke geslachten u voor vervollexperimenten wil inzetten. Een besluit over deze keuze kan niet aan de IvD gemandateerd worden. Na het uitvoeren van de eerste experimenten dient u middels een wijziging bij de CCD beargumenteerd terug te koppelen welk geslacht of welke geslachten u voor de vervollexperimenten gaat inzetten. U kunt met uw project "Uittesten van veiligheid van respiratoire humane challenge virussen in verschillende proefdier modellen" starten. De vergunning wordt afgegeven van 8 juni 2016 tot en met 30 april 2021. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie [REDACTED]. Dit advies is opgesteld op 20 mei 2016. 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. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Aanvullend worden de twee algemene voorwaarden en een voorschrift aan de vergunning verbonden.

Het DEC-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 gegevens 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).

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

[REDACTED]
Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

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: BioXpert bv
Adres: Nistelrooise Baan 3
Postcode en woonplaats: 5347 RE Schaijk
Deelnemersnummer: 90500

deze projectvergunning voor het tijdvak 8 juni 2016 tot en met 30 april 2021, voor het project "Uittesten van veiligheid van respiratoire humane challenge virussen in verschillende proefdier modellen" met aanvraagnummer AVD905002016413, volgens advies van Dierexperimentencommissie [REDACTED]

[REDACTED] De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

Voor de uitvoering van het project is Voorzitter IvD verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 30 maart 2016
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 24 mei 2016;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 24 mei 2016;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 20 mei 2016, ontvangen op 20 mei 2016;
 - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 24 mei 2016.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Veiligheid van influenza virus voor humaan gebruik	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	1200	Licht
Veiligheid van influenza virus voor humaan gebruik	Fretten (<i>Mustela putorius furo</i>)	600	Matig
Veiligheid van respiratoir syncytieel virus voor humaan gebruik	Andere knaagdieren (andere Rodentia) / Katoenratten	600	Licht
Veiligheid van respiratoir syncytieel virus voor humaan gebruik	Fretten (<i>Mustela putorius furo</i>)	300	Matig
Veiligheid van rhinovirus voor humaan gebruik	Andere knaagdieren (andere Rodentia) / Katoenratten	300	Licht

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

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.

Voorschrift

In de bijlagen 3.4.4.2 en 3.4.4.3 beschrijft u dat u voor de katoenratten een eerste experiment met beide geslachten uitvoert. Op basis van de uitkomsten van deze eerste experimenten komt u tot de conclusie welk geslacht, of welke geslachten u voor vervollexperimenten wil inzetten. Een besluit over deze keuze kan niet aan de IvD gemandateerd worden. Na het uitvoeren van de eerste experimenten dient u middels een wijziging bij de CCD beargumenteerd terug te koppelen welk geslacht of welke geslachten u voor de vervollexperimenten gaat inzetten.

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 van Economische Zaken 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 blijven schade

Datum

8 juni 2016

Onze referentieAanvraagnummer
AVD905002016413

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 13c 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 13d 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.