

<b>Inventaris Wob-verzoek W17-07</b>										
		<b>wordt verstrekt</b>				<b>weigeringsgronden</b>				
<b>nr.</b>	<b>document NTS 2016803</b>	<b>reeds openbaar</b>	<b>niet</b>	<b>geheel</b>	<b>deels</b>	<b>10.1.c</b>	<b>10.2.e</b>	<b>10.2.g</b>	<b>11.1</b>	
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS initieel	x								
3	Project proposal				x			x		
4	bijlage dierproeven 1				x			x		
5	bijlage dierproeven 2				x			x		
6	DEC advies				x		x	x		
7	ontvangstbevestiging				x		x	x		
8	Advies CCD aan bestuur		x						x	
9	Beschikking				x		x	x		



28 DEC. 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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl) of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	11400
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
		KvK-nummer	64156338
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>	Straat en huisnummer	de Boelelaan 1117
		Postbus	
		Postcode en plaats	1081HV Amsterdam
		IBAN	
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

- 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 |  | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> 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 | 1-1-2018 |
| Einddatum  | 1-1-2023 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- The role of mycobacterial lipid bodies in antibiotic tolerance, towards better understanding of persistent Mycobacterium tuberculosis
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De rol van mycobacteriële vetbolletjes in antibiotica tolerantie, Voor een beter begrip van persistente Mycobacterium tuberculosis
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |   |
|-------------|---|
| Naam DEC    | DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum |
| Postadres   | Amsterdam   Nederland                       |
| E-mailadres |   |

## 4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1187 Lege

Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.

Via een eenmalige incasso

Na ontvangst van de factuur\*

*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

\* Wanneer de factuur direct naar de financiële afdeling van de VU of het VUmc dient te gaan moet hier een inkoopordernummer en factuuradres worden toegevoegd door de onderzoekers, graag van te voren afstemmen met de financiële afdeling.

Inkoopordernummer: [REDACTED]

Factuuradres:

[REDACTED]

VU medisch centrum  
t.a.v. crediteuren administratie

[REDACTED]

Postbus 7057  
1007 MB Amsterdam

Graag verzoeken we de CCD om het bovenstaande inkoopordernummer aan de factuur toe te voegen en de factuur te versturen naar het factuuradres.

## 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	[REDACTED]
Functie	[REDACTED]
Plaats	Amsterdam
Datum	22 - 12 - 2016
Handtekening	[REDACTED]



## Melding Machtiging

- U kunt met dit formulier een machtiging afgeven of beëindigen.
- U machtigt een natuurlijk persoon (zoals een adviseur) of een rechtspersoon (zoals een BV, stichting, vereniging) om uw zaken voor u te behartigen. De machtiging is voor maximaal vijf jaar geldig.
- Meer informatie vindt u op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).

### 1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.
- |                                |            |
|--------------------------------|------------|
| Naam van de portefeuillehouder | [REDACTED] |
| KvK-nummer                     | 64156338   |
| NVWA deelnemernummer           | 11400      |

### 2 Gegevens gemachtigde

- 2.1 Vul één van deze nummers van de gemachtigde in: KvK-nummer, of Burgerservicenummer (BSN) Geef aan welk nummer u invult.
- |   |            |
|---|------------|
| <input type="checkbox"/> KvK-nummer     | [REDACTED] |
| <input checked="" type="checkbox"/> BSN | [REDACTED] |
- 2.2 Wat zijn de gegevens van de gemachtigde?
- |                    |                      |   |
|--------------------|----------------------|---|
| Naam gemachtigde   | [REDACTED]           | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Adres of postbus   | [REDACTED]           |   |
| Postcode en Plaats | [REDACTED] Amsterdam |   |

### 3 Inhoud machtiging

- 3.1 Wilt u een nieuwe machtiging afgeven?  Ja > Geef bij vraag 3.3 aan wat de gemachtigde voor u mag doen.  Nee
- 3.2 Wilt u een machtiging intrekken?  Ja > Ga door naar vraag 4  Nee
- 3.3 Wat mag de gemachtigde voor u doen?
- Een projectvergunning aanvragen
  - Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
  - Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
  - Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift.
  - Alle bovenstaande opties

### 4 Ondertekening

- 4.1 Onderteken het formulier en stuur het als bijlage met uw aanvraag mee via de beveiligde e-mailverbinding of per post:
- Ik heb dit formulier volledig en naar waarheid ingevuld. Ik verklaar dat ik bekend ben met alle voorwaarden van wet en regelgeving (Wod, dierproevenbesluit en dierproevenregeling).

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Naam gemachtigde

[Redacted]

Datum

1 6 - 0 8 - 2 0 1 6

Handtekening  
portefeuillehouder  
van de instelling

[Redacted]

Handtekening  
gemachtigde



## 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul 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 the Western world there is limited awareness of the harm caused by tuberculosis (TB). This disease accounted for nearly 1.5 million deaths in 2014, which means that every single minute three individuals died of tuberculosis (ISBN 978-92-4-156505-9). *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), the causative agent of TB, is a facultative intracellular pathogen. It is able to remain viable in the host for decades after infection. It withstands (harsh) host attack mechanisms by forming so-called 'persister' cells, a form of bacterial cells that are tolerant to drugs. Because of this phenomenon, the current 'short-course' therapy to treat TB is a staggering six months, with a combination of up to 4 different antibiotics. Problems with compliance are often seen in these patients and if left untreated or not treated well, years or decades later persister cells can reactivate and give rise to active disease and, concomitantly, further spread of the disease. Therefore there is an urgent need for shorter treatment of TB. This can be accomplished by targeting the persister population of *M. tuberculosis*.

Unfortunately, little is known about the formation and behavior of persister cells of *M. tuberculosis*, knowledge that is required to develop drugs against this population. However, we do know that they are tolerant to drugs. This drug tolerance is not induced by genetic alterations in the genome (*genotypic* drug resistance), but based on *phenotypic* drug tolerance. Such drug tolerance was already observed in 1944, where Joseph Bigger was unsuccessful in sterilizing a culture of *Staphylococcus* with penicillin. (review PMID: 26104360). Indeed, a biphasic killing shows the presence of persisters upon treatment of *M. tuberculosis* (e.g. PMID: 19686043, PMC3119538) However what causes this drug tolerance in persisters remains largely unknown. Interestingly, one of the key characteristics of persisters is the formation of lipid bodies, round shaped organelles consisting of neutral lipids. Though the existence of lipid bodies is already known for a long time (PMC518253), the exact role of these organelles in *M. tuberculosis* is still unknown. However, recent work showed a correlation between the presence of lipid bodies and observed drug tolerance in vitro (PMID: 26163401, PMC2698117). Lipid bodies seem to form in the presence of host lipid products (PMC3121879). Such lipids can be used as an energy source, implying that *M. tuberculosis* benefits from host-derived lipids (PMC451596, PMC1464426). Alternatively, it has been hypothesized that mycobacteria form lipid bodies to detoxify certain fatty acids, which could harm the bacteria by impairing the membrane function (PMID: 23701589, PMC1112053). This controversy further indicates that the role of these bacterial lipid bodies during *M. tuberculosis* infection is still unclear.

So phenotypic drug tolerance is observed in persisters and lipid body formation is a well-described phenomenon in these cells. Previous work showed a correlation between observed drug tolerance and presence of lipid bodies in vitro. We would like to study whether lipid body formation in mycobacteria is essential for persister formation and whether lipid bodies have a role in antibiotic tolerance in vivo.





Figure 1. [Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

So, ultimately, this project will lead us to the understanding of the role of lipid bodies in antibiotic tolerance observed in mycobacterial persisters *in vivo*. We will determine whether lipid body formation is essential for persister formation *in vivo* and if they are the cause of antibiotic tolerance *in vivo*. When lipid bodies are indeed involved in persister formation and/or antibiotic tolerance, we can target the identified proteins that play a role in lipid body formation and directly kill this form or prevent further development of persisters such that they remain susceptible to current anti-TB drugs.

The researchers have longstanding expertise within the TB field and also to the topic of this proposal. We believe that understanding the molecular mechanisms underlying mycobacterial persistence is crucial to accelerate the development of effective drugs and vaccines for cure or prevention of TB. Therefore the main focus of the research group is to understand mycobacterial virulence (e.g. PMC523024 and PMID: 22256857). More specifically, we recently identified that a secretion system present in pathogenic mycobacteria is involved in transport of fatty acids across the membrane (PMC4418733), an important finding for step 2 in Figure 1.

### 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?

The goal of this project is to define the role of lipid bodies in persistent mycobacteria. The following questions will be answered within this project:

- Are lipid bodies essential for development of a persister cell *in vivo*?

[Redacted text]

- Are [Redacted] mutants more susceptible to anti-TB antibiotics *in vivo*?

This question will be answered by analyzing the bacterial load after antibiotic treatment.

[Redacted text]

[REDACTED]

The experiments will be performed at a specified (authorized) area at the department that is restricted to adult zebrafish infections only. Zebrafish (breed) are housed following standard procedures. An experienced technician will execute the experiments. We are specialized and highly experienced in performing both embryo and adult zebrafish mycobacteria experiments. [REDACTED]

### 3.3 Belang

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

#### *Social interest*

Treating TB in humans takes a minimum of six months, using a combination of antibiotics. Extensive (genotypic) drug resistant strains need even longer treatment, up to 2 years. Therefore, treatment is expensive and effective drugs are not always available in lower-income countries. Lack of compliance with long-term treatment schedules also promotes genotypic drug resistance. Lastly, TB drugs can have severe side effects.

As explained, persister cell formation is believed to be the reason for the need of prolonged treatment of TB. The presence of persisters is indeed identified in patient material (during treatment), based on transcriptomics, cultivability and lipid body positivity (PMC4825072 , PMC4548467, PMC4463005 and PMID: 24072170). Understanding persister cell formation and the role of lipid bodies in this is therefore crucial in our efforts to shorten duration of treatment and concomitant better and safer treatment of TB patients. More fundamental research on the mechanisms at the base of persister cell formation is urgently needed to direct research in this area.

#### *Scientific interest*

[REDACTED]  
Therefore we hope we can determine the role of lipid bodies in persister formation and antibiotic tolerance within the set timeframe. If we reach this, the obtained data would be of great interest for both scientists and industry focusing on vaccine and drug development. We do understand that the development of drugs and vaccines takes many more years until a final product is developed. Nevertheless there is a need for relevant vaccine candidates, antigens that are important for survival of the TB bacillus in the host, and new drug targets, We hope to find targets that can be used for the development of vaccines and anti-TB drugs. [REDACTED]

On a longer run, both latent and active TB patients, but also individuals at risk of becoming infected may benefit from this work. When key mechanisms of lipid body formation are targeted, persisters will not be formed or will be eliminated, making the bacterial population sensitive to antibiotic treatment. This will

hopefully shorten the duration of treatment and limit the development of genotypic drug resistance because of better compliance.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

[Redacted text]

To test that our hypothesis is true, we need [Redacted text]

As previously discussed, [Redacted text] experiments.

[Redacted text]

#### *Animal experiment 1: M. marinum virulence screening in adult zebrafish.*

It is uncertain whether lipid bodies are a key factor in persister formation and therefore virulence of the mutants need to be analyzed first. This is the first question as stated in 3.2. An *M. marinum* infection in zebrafish strongly reflects the disease state in human TB infection. In fact, the zebrafish model shows higher similarities to human TB disease than mouse TB models do. Mice are for example not able to generate robust encapsulated necrotic granulomas, whereas these are observed in *M. marinum* infected zebrafish. *M. marinum* infection in adult zebrafish does not always lead to disease, indicating that a latent TB infection occurs in zebrafish [Redacted text], which is also seen in humans. Therefore, we decided to use the zebrafish infection model to study virulence. [Redacted text]

[Redacted text]

#### *Animal experiment 2 Antibiotic susceptibility testing using the [Redacted text] zebrafish mode of tuberculosis.*

When we know the infection behavior/virulence of the mutants, we can continue to study the antibiotic susceptibility of the mutants, which is the following question as stated in 3.2. Adult zebrafish have a full functional immune system which is required to trigger the formation of persister cells. [Redacted text]

[Redacted text]

Before we can test antibiotic susceptibility, we have to adapt the zebrafish infection model such that an antibiotic treatment is included to treat the infection. [REDACTED]

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

1. *M. marinum virulence screening in adult zebrafish:*

[REDACTED] In short, a maximum of 3024 adult zebrafish will be infected with [REDACTED]

[REDACTED] the infection will be monitored by observing loss of body weight and development of clinical symptoms of disease, which involves (i) the formation of lesions, (ii) lethargy and changes in consumption behavior. The mutants will be divided in different groups, [REDACTED]. Importantly, when we observe a clear difference between wild-type and a mutant, we will stop testing the remainder mutants.

- *Severity of experiment 1:*

Of the maximum of 3024 zebrafish, 37.5% will encounter mild discomfort whereas 61.3% will encounter moderate discomfort, due to the development of disease. The use of human endpoints will prevent the fish from severe discomfort from the infection. This experiment requires two interventions (injection and sacrifice).

2. *Antibiotic susceptibility testing using the [REDACTED] zebrafish model of tuberculosis:*

This experiment consists of two phases. The first phase is the setup of the [REDACTED] model in adult zebrafish. [REDACTED].

Treatment will start when the infection has set and loss of body weight is observed. [REDACTED]

[REDACTED]. When reactivation occurs, we continue with phase 2. Here we study the antibiotic susceptibility of the obtained mutants, using the model from phase 1. Not all mutants will be tested in once [REDACTED]. When we observe loss of antibiotic tolerance, we will stop testing the other mutants.

- *Severity of experiment 2:*

Experiment 2a: from the 342 zebrafish, 5.26% will encounter mild discomfort, whereas 94.74% will encounter severe discomfort. Experiment 2b: Of the maximum of 3024 zebrafish, 6.66% will encounter mild discomfort, whereas 93.33% will encounter severe discomfort.

This experiment requires the following interventions (including the severity):

Injection = mild discomfort. This requires a single injection to infect the zebrafish. The zebrafish will receive anesthetics prior injection.

Antibiotic treatment = severe discomfort. The zebrafish will be treated after infection with antibiotics [REDACTED]. The zebrafish will receive anesthetics prior treatment. [REDACTED]

[REDACTED]. This part of the experiment is classified as severe because of the frequency of treatment. [REDACTED]

[REDACTED] Importantly, when experiment 2a shows that the bacterial load is strongly reduced within less than [REDACTED], we will treat the zebrafish in experiment 2b for the new set time period, such that we reduce the time of severe discomfort.

Immunosuppressant treatment = moderate discomfort. [REDACTED]

[REDACTED]. The fish will not

encounter any discomfort from this intervention directly, but due to the intervention will start to develop disease symptoms. This will therefore be moderate discomfort. To prevent further discomfort, we will sacrifice fish when we observe clinical symptoms (human endpoints).  
Sacrifice = mild discomfort

For both experiments a daily welfare diary will be used. The following phenotypic behaviors will be tracked during the entire experiment (1 and 2):

- (i) Lesion formation on the skin and raised scales. These are classical symptoms observed in an *M. marinum* infected fish that develops disease.
- (ii) Lethargy. When disease develops, the zebrafish will either remain on the bottom of the tank or float to the top.
- (iii) Consumption behavior. When disease develops, the zebrafish will consume less.

Human endpoints are based on these three measurements. In case we observe clear change in behavior and/or lesion formation, we will sacrifice the zebrafish. Thus human endpoints will be monitored on a regular basis.

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.



Experiment 1, *M. marinum* virulence screening in adult zebrafish, will be performed to test whether lipid bodies are a key factor in persister formation.

When we do not have mutants, we will not start this experiment. Experiment 1 will be divided in groups. When we observe clear difference







## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef   |
|------------|--|
| 1          | <i>M. marinum</i> virulence screening in adult zebrafish |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

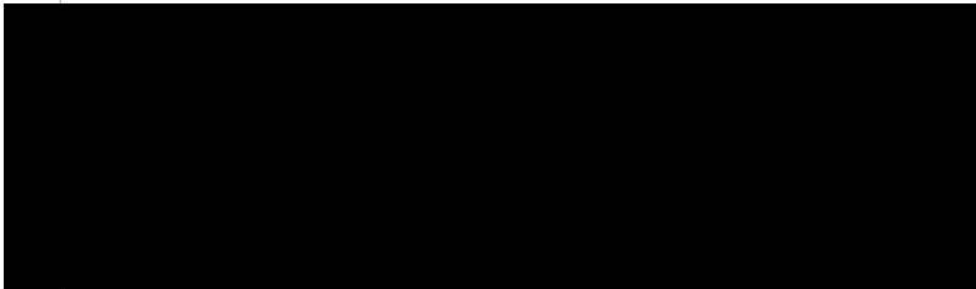
### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

[Redacted content]

Figure 1. [REDACTED]



The following readouts will be determined during this experiment

*Bacterial load (endpoint measurement)*

The bacterial load (+) will be determined [REDACTED]  
[REDACTED] A total of 18 zebrafish will be used for every time point.

*Loss of body weight*

When disease develops, the fish will start to lose body weight, therefore we will monitor the weight of the fish over time. For every time point (\*), we will weigh the fish that are selected for bacterial load determination, thus 18 fish per time point.

*Clinical signs of illness*

A welfare diary will be used to track the following phenotypic behaviors of the fish during the entire experiment: (i) lesion formation on the skin and raised scales. These are classical symptoms observed in an *M. marinum* infected fish that develops disease. (ii) Lethargy and (iii) consumption behavior. Human endpoints are used to prevent severe discomfort as a result of the infection.

In addition to determination of bacterial load as a function of virulence, we aim to study the survival time of the adult zebrafish. For this study we will perform a Kaplan Meier analysis. The survival time will be based on the human endpoints definitions described before. Data for this analysis will be derived from the aforementioned readouts and therefore an additional group is not required.

---

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.

Every intervention (detailed below) will take place under full anesthesia to limit stress and pain. [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

Interventions

- 1x intraperitoneal injection of [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]
- Body weight measurements will be performed before sacrifice for bacterial load determination (as [REDACTED])
- Sacrifice using [REDACTED].

Analysis of clinical symptoms is not considered an intervention as the fish are only observed without disturbing their normal behavior.

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

Calculation:

Kaplan Meier: We use a power of 80% and a confidence of 95% to determine the minimal amount of zebrafish required. [REDACTED] Based on these numbers we 16 zebrafish for every group.

Bacterial load: We expect to determine a difference of 50% between the mean of the number of bacteria per fish (100% for group 1 and 50% for group 2) (using a power of 80% and a confidence of 95%) and therefore we need 8 fish per group. As The Kaplan Meier and bacterial load can both be determined on the same fish, we will need a total of 16 fish per group.

## B. De dieren

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

Animal: Zebrafish (male and female, equally distributed)

Species: Danio rerio

Age: 9 months

[REDACTED]  
Maximum number of required zebrafish:

We expect to obtain a maximum of 20 mutants [REDACTED]

We calculated that we need 16 zebrafish per group. Two zebrafish are added because of possible loss due to infection procedure. Therefore 18 fish per time point are required. We have [REDACTED]

[REDACTED]. This is for one bacterial strain (wild type or mutant). We expect a total of 20 mutants that need to be tested, plus a wild type strain as a control. That would mean 21 groups in total. 144 zebrafish per group \* 21 groups brings us to **3024** zebrafish total.

We will split the number of mutants in different groups. When we observe clear difference between [REDACTED]

[REDACTED] first group(s), we will stop testing the remainder mutants. The selected mutants will further be analyzed in experiment 2, preferably together with at least one mutant that did not differ from the wild type (in case we detect such a mutant). This because we can then further determine whether the formation of a persister cell is essential for antibiotic tolerance and not only the presence of lipid bodies.

## 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.



---

**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.

To prevent pain and stress, the fish receive anesthetics (MS-222) prior to injection, body weight measurement and bacterial load determination.

██  
██  
██  
██

---

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

---

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

The fish will develop disease and to prevent severe discomfort, specific humane endpoints will be used to sacrifice the fish.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

The fish will suffer from disease symptoms and progression.

---

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

Use of humane endpoints will be applied.

---

**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.

---

A welfare diary will be used to track the following phenotypic behaviors of the fish during the entire experiment:

- (i) Lesion formation on the skin and raised scales. These are classical symptoms observed in an *M. marinum* infected fish that develops disease.
- (ii) Lethargy. When disease develops, the zebrafish will either remain on the bottom of the tank or float to the top.
- (iii) Consumption behavior. When disease develops, the zebrafish will consume less.

Human endpoints are based on these three measurements. In case we observe clear change in behavior and/or lesion formation, we will sacrifice the zebrafish.

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

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED], we expect that 37.5% of wild type and [REDACTED] conditions will reach the humane endpoint criteria (594 zebrafish from a total of 1584 zebrafish (11 groups)), whereas for the [REDACTED] strains (10 groups) this will count for 87.5% (1260 zebrafish from a total of 1440 zebrafish).

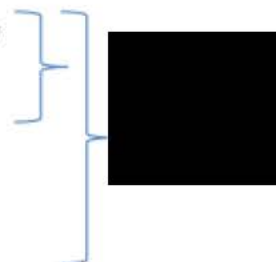
#### K. Classificatie van ongerief

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.

All 3024 zebrafish (100%) will receive anesthetics via a water bath prior 1x intraperitoneal injection [REDACTED] = **mild discomfort**

All zebrafish 3024 (100%) will receive anesthetics via a water bath prior body weight measurement and subsequent ice bath and decapitation to sacrifice the zebrafish = **mild discomfort**

18\*21 = 378 (12.5%) zebrafish will be infected for 8 weeks with *M. marinum*  
756 (25%) zebrafish will be infected for 7 weeks with *M. marinum*  
1134 (37,5%) zebrafish will be infected for 6 weeks with *M. marinum*  
1512 (50%) zebrafish will be infected for 5 weeks with *M. marinum*  
1890 (62,5%) zebrafish will be infected for 4 weeks with *M. marinum*  
2268 (75%) zebrafish will be infected for 3 weeks with *M. marinum*  
2646 (87,5%) zebrafish will be infected for 2 weeks with *M. marinum*  
3024 (100%) zebrafish will be infected for 1 week with *M. marinum*



[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

Thus a total of 1854 zebrafish, 61,3% of the total group of zebrafish will develop disease symptoms. We scale the development of disease to **moderate discomfort**. We sacrifice the fish when we observe clinical symptoms (human endpoints, as described in part J).

**38,7% of the zebrafish = mild discomfort**  
**61,3% of the zebrafish = moderate discomfort**

## 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.

To be able to measure the bacterial load we need to isolate organs from the animals

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.

The zebrafish will be sacrificed using ice bath followed by decapitation. Although this method is not formally approved yet, the IvD VU/VUmc has been informed that a general exemption is in preparation and the NVWA inspectorate will accept this method already.

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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11400				
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VU Medisch Centrum				
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Antibiotic susceptibility testing using the [redacted] zebrafish model of tuberculosis</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	2	Antibiotic susceptibility testing using the [redacted] zebrafish model of tuberculosis
Volgnummer	Type dierproef				
2	Antibiotic susceptibility testing using the [redacted] zebrafish model of tuberculosis				

*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.

A subset of mycobacteria is able to withstand antibiotic treatment, known as so-called persisters. This form of bacteria have been identified in sputa of *M. tuberculosis* infected individuals that were treated with antibiotics. This population cannot be cultured on plate but can in liquid or when resuscitated (PMID: 24072170, PMC2809243). Furthermore, transcriptomics of *M. tuberculosis* population in sputa shows a 'fat and lazy (slow-growing)' persister like form of *M. tuberculosis* (PMC2276522), which is maintained in persisting *M. tuberculosis* during drug treatment (PMC4825072) and lacks a stress response to anti-TB drug (PMC4548467). Most of the *M. tuberculosis* infected individuals are latent infected, which means that they are infected with the bacterium but do not show any clinical symptoms. After infection, bacteria are not always cleared by the immune system as 5-10% will develop disease within 2 years after infection (PMID: 823803, 16899146 and 16267499), although reactivation has also been described to occur decades after infection (PMID: 12198629). [redacted]

The goal of the described experiment is to test the change in antibiotic susceptibility of [redacted] mutants. This will be determined based on the bacterial load present in the zebrafish after antibiotic treatment [redacted]



[REDACTED]

[REDACTED] Based on these previous studies we will adjust the infection zebrafish model by adding a treatment and immune suppression step after infection, [REDACTED].

The proposed experiment consists of two phases. The first phase is the setup of the [REDACTED] model in adult zebrafish and the second phase will be the study of antibiotic susceptibility of the [REDACTED] mutants in this model.

**Phase 1.**

Define the windows of reactivation for wild type *M. marinum* and a known [REDACTED] mutant strain.

[REDACTED]

[REDACTED] reactivation

Zebrafish will be infected with wild-type *M. marinum* and a known [REDACTED] strain. Infection procedure is identical as performed in *M. marinum* virulence screening in adult zebrafish (*Bijlage 1*). Treatment will start when the infection has set and loss of body weight is observed (maximum of 30%). [REDACTED]

[REDACTED] After withdrawal of the immunosuppressant, the fish will be monitored [REDACTED]

Figure 1. [REDACTED]



The following readouts will be determined during this experiment:

*Bacterial load (endpoint measurement)*

The bacterial load (†) will be determined [REDACTED]. A total of 9 zebrafish will be used for each of these time points. To estimate the reactivation, the bacterial load (†) will also be determined, however, this requires 18 zebrafish per time point. During immunosuppression, bacterial load will be determined [REDACTED].

### *Loss of body weight*

When TB develops, the fish will start to lose body weight. This measurement is required to determine the time of treatment as well as the reactivation of disease after treatment. Body weight (★) of the zebrafish will be measured prior bacterial load determination but also includes 6 more time points in the infection week. Nine randomly selected fish will be weighted and put back in tray afterwards for this 6 additional days. At intervention days, all fish undergoing intervention will be weighed.

### *Clinical signs of illness*

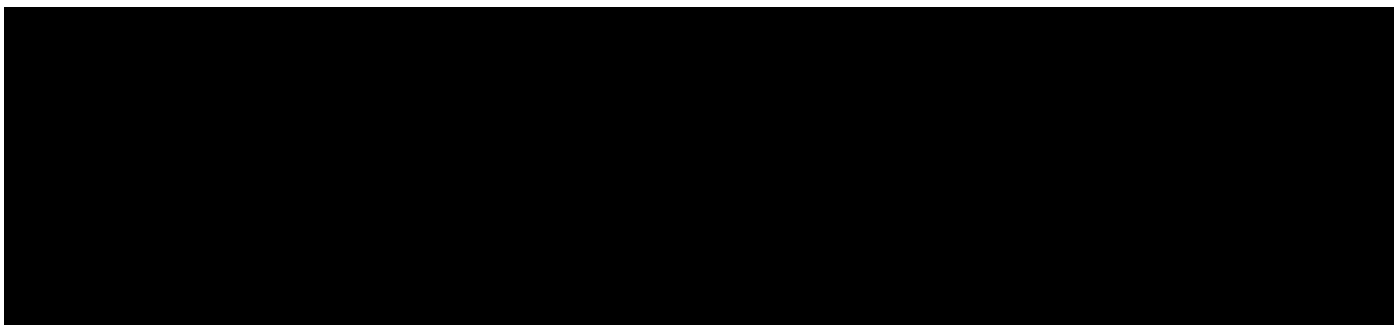
A daily welfare diary will be used to track the following phenotypic behaviors of the fish during the entire experiment: (i) lesion formation on the skin and/or raised scales, (ii) lethargy and (iii) consumption behavior.

The bacterial load derived from the immunosuppression and monitoring groups will be used to determine the rate of reactivation.

## **Phase 2**

After setup of the model we expect to limit the number of time points required to measure the bacterial load and body weight. In phase 2 the antibiotic susceptibility of the selected [REDACTED] mutants. [REDACTED]

### Figure 2. [REDACTED]



The following readouts will be determined during this experiment:

### *Bacterial load (endpoint measurement)*

The bacterial load (†) will be determined [REDACTED]

[REDACTED] A total of 9 zebrafish will be used for these time points.

To estimate the reactivation, the bacterial load (†) will also be determined, however this requires 18 zebrafish per time point. During immunosuppression, bacterial load will be determined [REDACTED]

### *Loss of body weight*

When disease develops, the fish will start to lose body weight. This measurement is required to determine the time of treatment as well as the reactivation of disease after treatment. Body weight (★) of the zebrafish will be measured prior bacterial load determination but also includes 6 more time points in the infection week. Nine randomly selected fish will be weighted and put back in tray afterwards for this 6 additional days. At intervention days, all fish undergoing intervention shall be weighed.

### *Clinical signs of illness*

A daily welfare diary will be used to track the following phenotypic behaviors of the fish during the entire experiment: (i) lesion formation on the skin and/or raised scales, (ii) lethargy and (iii) consumption behavior.

The bacterial load derived from the immunosuppression and monitoring groups will be used to quantify

reactivation.

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.

Every intervention (detailed below) will take place under full anesthesia to limit stress and pain. [REDACTED]

[REDACTED]

Interventions:

- 1x intra peritoneal injection with [REDACTED]
- [REDACTED] antibiotic treatment [REDACTED]
- [REDACTED] treatment with immunosuppressant [REDACTED]
- Body weight measurements will be performed before sacrifice for bacterial load determination. 6 additional time points will include body weight measurement only and will be performed directly after exposure to anesthetics.
- Sacrifice using ice bath and decapitation (see L), followed by isolation of the organs.

Analysis of clinical symptoms is not considered an intervention as the fish are only observed without disturbing their normal behavior.

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

Calculation:

Reactivation: Determine bacterial load for both wild-type *M. marinum* and the [REDACTED] mutant. Reactivation of *M. marinum* in adult zebrafish has previously been studied [REDACTED]

[REDACTED]

Bacterial load: In order to determine a difference of 50% between the mean of the number of bacteria per fish (100% for group 1 and 50% for group 2) (using a power of 80% and a confidence of 95%) we need 8 fish per group.

## B. De dieren

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

Animal: Zebrafish (male and female, equally distributed)

Species: Danio rerio

Age: 9 months

Maximum number of required zebrafish:

Phase 1:

Five time points are selected for the determination of the bacterial load during infection and treatment. We need 8+1 zebrafish per group, thus  $5 * 9 = 45$  zebrafish for the first part of the experiment (infection and treatment). In the second part (immunosuppression and monitoring) we expect reactivation to occur and calculated 16+2 zebrafish per group. We have 7 time points, thus  $7*18 = 126$  zebrafish for the second part. A total of  $45 + 126 = 171$  zebrafish is required per condition (wild type or mutant). In phase one we have a wild type and a [redacted] strain and therefore the total number of zebrafish required in phase 1 =  $171*2 = 342$  zebrafish.

Phase 2:

We expect to obtain a maximum of 20 mutants [redacted]

We expect to decrease the number of time points required in phase 2 compared to phase 1. This because we know from phase 1 at which time reactivation sets in. Five time points are taken in the first part of the experiment (infection and treatment) thus  $5*9$  zebrafish = 45 for the first part. The second part (immunosuppression and monitoring) holds 5 time points and required per time point 18 zebrafish, thus  $5 * 18 = 90$  zebrafish. So per condition  $45+90 = 135$  zebrafish are required.

We expect a maximum of 20 mutants to be tested. Because we do not want to test 20 mutants in one experiment, we have to split the groups. [redacted]

[redacted] Thus every group consists of 3 mutants \* 135 zebrafish = 405 zebrafish. When we calculate for the maximum of mutants we need  $20 * 135 = 2700$  zebrafish for this experiment. However, we expect to see a difference already within the first set of mutants and this would already show that [redacted] mutants are more susceptible to antibiotics. This would mean that we will not test all the mutants when we already see an effect in the first group.

Phase 1 and phase 2:

So we need a maximum of **3042** zebrafish for both experiments.

## 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.

##### *Replacement:*

The host immune system is required to suppress infection and induce persister formation of mycobacteria. These persisters withstand treatment and cause reactivation after withdrawal of treatment. This delicate co-existence is required to study antibiotic susceptibility measured as reactivation for the mutants. Therefore, it is not possible to test this antibiotic susceptibility *in vitro*.

##### *Reduction:*

Importantly, in this proposal the maximum number of zebrafish required to test 20 mutants is given.

However, the mutants will be tested in different rounds, [REDACTED]

[REDACTED] We expect to see a difference already within the first set of mutants, showing that [REDACTED] mutants are more susceptible to antibiotics. In this case, we will not test all the mutants. As a result, this would lead to a strong reduction in zebrafish required; 405 zebrafish will be used instead of 2295. Furthermore, by performing phase 1 in this experiment, we will be able to decrease the number of time points (less treatment time / less time points during monitor phase).

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
Furthermore, both male and female fish will be used in this experiment, and therefore less fish are lost during breeding. Also, fish selected for body weight measurement will subsequently be sacrificed for bacterial load determination. This means that one fish will provide information for two measurements and therefore less animals are required for this experiment

##### *Refinement:*

[REDACTED] When the results show that strong reduction of CFU is achieved in a shorter time, we will use this for experiment 2b. This will reduce the time of severe discomfort. [REDACTED]

[REDACTED] To reduce the stress and pain for the fish, multiple interventions will be performed at once. Body weight measurement will be combined with antibiotic treatment or immunosuppressant treatment. We will start treatment of the fish well before severe disease symptoms appear, reducing the discomfort of the animals. Finally, not all fish have to be weighed at every time point, limiting discomfort by reducing intervention.

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.

Every intervention is only performed when the fish are anesthetized. Furthermore the animals will be monitored for development of clinical symptoms. Once severe disease is observed, the animal will be sacrificed.

## 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.

The single components/steps required in this zebrafish [REDACTED] model have been published [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]. However, combining the components in order to develop the [REDACTED] model in adult zebrafish has not been done before.

## 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.

To prevent pain and stress, the fish receive anesthetics (MS-222) prior to injection or other interventions.

## I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

The frequency of interventions are relatively high. First fish will be infected, such that they become infected with *M. marinum*. After onset of the infection an intense antibiotic treatment regimen will start to clear the infection. After treatment, the immune system will be suppressed to induce reactivation, making them vulnerable for disease again. This is an intense trajectory and therefore we try to limit distress as much as possible by the aforementioned reductions and refinements.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

The frequency of interventions.

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

We cannot change the frequency of interventions. We can limit damaging effects by adequate care of the zebrafish by professionals and the use of human endpoints such discomfort will be limited.

## 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.

A welfare diary will be used to track the following phenotypic behaviors of the fish during the entire experiment:

- (i) Lesion formation on the skin and raised scales. These are classical symptoms observed in an *M. marinum* infected fish that develops disease.
- (ii) Lethargy. When disease develops, the zebrafish will either remain on the bottom of the tank or float to the top.
- (iii) Consumption behavior. When disease develops, the zebrafish will consume less.

Human endpoints are based on these three measurements. In case we observe clear change in behavior and/or lesion formation, we will sacrifice the zebrafish.

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

Fish will be treated before the onset of severe disease. However, after the end of treatment and immune suppression, reactivation is expected to occur. This includes the groups that are used to determine reactivation. After reactivation, it takes time to develop severe disease. Therefore upon start of immunosuppression we expect development of severe disease. So if we assume all fish to show reactivation, we estimate that in phase 1, 73.7% of the zebrafish will develop severe disease. For phase 2, this accounts for 75% of the fish. [REDACTED].

## 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.

*Experiment 2a.*

All 342 zebrafish (100%) will receive anesthetics via a water bath prior 1x intraperitoneal injection of [REDACTED] = **mild discomfort**

All 342 zebrafish (100%) will receive anesthetics via a water bath prior body weight measurement and subsequent ice bath and decapitation to sacrifice the zebrafish = **mild discomfort**

108 zebrafish (31,6%) will receive anesthetics via a water bath prior weighing and put back in the tank = **mild discomfort**

324 zebrafish (94,74%) will receive anesthetics via a water bath prior [REDACTED] antibiotic treatment [REDACTED]

One time would be mild/moderate discomfort, however because of the frequency this intervention leads to **severe discomfort**.

252 zebrafish (73,7%) will receive treatment with immunosuppressant for a . The fish will not encounter any discomfort from this intervention directly, but due to the intervention will start to develop disease symptoms, this will therefore be **moderate discomfort**. To prevent further discomfort, we will sacrifice fish when we observe clinical symptoms (human endpoints, as described in part J).

**5,26% of the zebrafish = mild discomfort**  
**94,74% of the zebrafish = severe discomfort**

### Experiment 2b

All 2700 zebrafish (100%) will receive anesthetics via a water bath prior 1x intraperitoneal injection of = **mild discomfort**

All 2700 zebrafish (100%) will receive anesthetics via a water bath prior body weight measurement and subsequent ice bath and decapitation to sacrifice the zebrafish = **mild discomfort**

1080 zebrafish (40%) will receive anesthetics via a water bath prior weighing and put back in the tank = **mild discomfort**

2520 zebrafish (93,33%) will receive anesthetics via a water bath prior antibiotic treatment . One time would be mild/moderate discomfort, however because of the frequency this intervention leads to **severe discomfort**. Importantly, this treatment time period will be shortened when experiment 2a shows that strong bacterial load reduction is observed before the end of of treatment. This reduces the time of severe discomfort in this group of zebrafish.

1800 zebrafish (66,66%) will receive treatment with immunosuppressant . The fish will not encounter any discomfort from this intervention directly, but due to the intervention will start to develop disease symptoms, this will therefore be **moderate discomfort**. To prevent further discomfort, we will sacrifice fish when we observe clinical symptoms (human endpoints, as described in part J).

**6,66% of the zebrafish = mild discomfort**  
**93,33% of the zebrafish = severe discomfort**

---

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

To be able to measure the bacterial load we need to isolate organs from the animals

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.

The zebrafish will be sacrificed using ice bath followed by decapitation. Although this method is not formally approved yet, the IvD VU/VUmc has been informed that a general exemption is in preparation and the NVWA inspectorate will accept this method already.

Ja



# Format DEC-advies

---

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:  
*NVWA nummer 11400*
2. Titel van het project:  
*The role of mycobacterial lipid bodies in antibiotic tolerance, towards better understanding of persistent Mycobacterium tuberculosis*
3. Titel van de NTS:  
*De rol van mycobacteriële vetbolletjes in antibiotica tolerantie, voor een beter begrip van persistente Mycobacterium tuberculosis*
4. Type aanvraag:  
*Nieuwe aanvraag projectvergunning*
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: *11-10-2016*
  - aanvraag compleet: *11-10-2016*
  - in vergadering besproken: *08-11-2016*
  - anderszins behandeld: *n.v.t.*
  - termijnonderbreking(en) van / tot: *n.v.t.*
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
  - aanpassing aanvraag: *25-11-2016*
  - advies aan CCD: *22-12-2016*
7. Afstemming IvD
  - Datum advies IvD: *11-10-2016*
  - Strekking advies IvD: *De IvD geeft aan dat de aanvrager het project met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.*
8. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*
9. Correspondentie met de aanvrager

### Vraagronde 1

- Datum: *10-11-2016*
- Strekking gestelde vragen: *De DEC vindt het een duidelijk en heldere aanvraag. De NTS moet tekstueel nog worden aangepast. De DEC heeft graag extra uitleg bij de hoeveelheid dieren, de duur van het ernstige ongerief en de humane eindpunten.*
- Datum antwoord: *25-11-2016*
- Strekking van de antwoord(en): *De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.*

- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) : *n.v.t.*

## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. *Is het project vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.*
3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. *N.v.t*

## **C. Beoordeling (inhoud)**

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld.*)

*Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk de individuele doelen afzonderlijk te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk de go/ no go momenten beschreven. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.*

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod?: *n.v.t.*
3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën fundamenteel en toegepast onderzoek zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

### **Belangen en waarden**

4. *Het directe doel van deze studie is het onderzoeken van de rol van mycobacteriële vetbolletjes in antibiotica tolerantie bij zebravissen, voor een beter begrip van persistente Mycobacterium tuberculosis (tuberculose).*

*Het uiteindelijke doel van de studie is deze kennis te gebruiken voor de ontwikkeling van nieuwe effectievere medicijnen tegen tuberculose. Hierdoor kan de duur van de tuberculose behandeling worden verkort en kunnen patiënten met tuberculose beter en sneller worden geholpen.*

*Het betreft hier fundamenteel en toegepast onderzoek. Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel in de toekomst te bereiken.*

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.

*De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op de ontwikkeling van nieuwe medicijnen voor de behandeling van tuberculose: de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten.*

*De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren ingrepen ondergaan en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: Het ontwikkelen van een effectievere behandeling tegen tuberculose. Hierdoor zal het welzijn van de patiënten en hun kwaliteit van leven verbeteren. Bovendien is antibiotica resistentie is een maatschappelijk probleem dat moet worden behandeld.*

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten: *n.v.t.*

### **Proefopzet en haalbaarheid**

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn.

*Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.*

*Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, evenals voldoende deskundigheid en financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er nauw samengewerkt met de academische wereld en andere instituten actief binnen dit onderzoeksveld.*

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

*De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De nieuw verkregen inzichten kunnen op termijn bijdragen aan het beschikbaar komen van een behandeling voor tuberculose. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel, gezien de beschrijving van de verschillende subonderdelen van het onderzoek.*

### **Welzijn dieren**

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: *n.v.t.*

*Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De locatie is binnen de instelling van de vergunninghouder. De dieren krijgen adequate verdoving en pijnbestrijding. De zebravissen zullen worden gedood door de dieren op ijs te koelen*

*en daarna te decapiteren. De IvD heeft vernomen dat de NVWA dit accepteert als geldige methode en dat er binnenkort een algemene vrijstelling voor deze dodingsmethode volgt.*

10. *De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn.*

11. *Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd.*

*Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd.*

*Het onderzoek bestaat uit 2 experimenten. In experiment 1 wordt licht ongerief verwacht als gevolg van injectie (bij ongeveer 39% van de zebravissen). Een groot deel van de zebravissen (ongeveer 62%) zal ziekte symptomen vertonen, de ontwikkeling van de ziekte wordt ingeschat als matig ongerief. De humane eindpunten zullen worden toegepast om ernstig ongerief te voorkomen. In experiment 2 wordt licht ongerief verwacht als gevolg van injecties. Een groot deel van de zebravissen (ongeveer 64%) zal ziekte symptomen vertonen, de ontwikkeling van de ziekte wordt ingeschat als matig ongerief. Daarnaast wordt bij de meeste zebravissen (ongeveer 94%) ernstig ongerief verwacht, dit komt door de frequentie van het toedienen van medicatie om de tuberculose te verminderen.*

12. *Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast*

*De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren injecties en medicatie krijgen toegediend. Daarnaast zullen de meeste dieren ziekte verschijnselen van tuberculose vertonen.*

13. *Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken.*

*De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. De humane eindpunten zullen worden toegepast, wanneer er duidelijke veranderingen in het gedrag plaatsvinden en/of laesie vorming optreedt.*

### **3V's**

14. *Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdiervrije methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.*

*Voorafgaand is er in celkweek onderzoek gedaan naar de bacteriestam die tuberculose veroorzaakt in vissen. Voor deze studie op het gebied van tuberculose is een intact immuunsysteem nodig om de bacteriële virulentie te testen. Een re-activatie vindt alleen plaats in een volwaardig werkend immuunsysteem, daarom is het gebruik van proefdieren noodzakelijk.*

*De keuze voor het gebruik van zebravissen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. In vissen ontwikkelt tuberculose zich op een gelijkwaardige wijze als in de mens. De bacteriestam die men gebruikt in de vissen is minder schadelijk waardoor het veilig is om mee te werken. Daarbij is de infectieduur van deze bacteriestam een stuk korter dan die van *M. tuberculosis*, de bacterie die tuberculose veroorzaakt in de mens, waardoor men sneller tot een antwoord op de*

*gestelde vragen kan komen. Bovendien is de zebravis de laagst mogelijke vertebraat waarbij tuberculose onderzoek mogelijk is.*

15. *In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven.*

*Door gebruik te maken van het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. In dit model wordt de re-activatie versneld, wat zorgt voor minder tijdspunten om te meten en dus ook minder vissen. Verder worden er uit 1 dier meerdere gegevens gehaald, waardoor er minder dieren nodig zijn. Op basis van eerder verkregen data hebben de onderzoekers een zorgvuldige schatting kunnen maken voor de hoeveelheid vissen die noodzakelijk is om tot een correcte conclusie te komen.*

*Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 6066 zebravissen en acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.*

16. *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.*

*Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. De vissen worden verdoofd voordat ze een ingreep zullen ondergaan.*

17. *Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt: n.v.t.*

### ***Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef***

18. *Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken.*

*Men zal gebruik maken van zowel vrouwelijke als mannelijke zebravissen.*

19. *Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef).*

*De dieren worden gedood om de bacterieload in de organen te kunnen meten. De zebravissen zullen worden gedood door de dieren op ijs te koelen en daarna te decapiteren. De IvD heeft vernomen dat de NVWA dit accepteert als geldige methode en dat er binnenkort een algemene vrijstelling voor deze dodingsmethode volgt.*

20. *Indien dieren worden gedood, is adoptie of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.*

*Dit is niet mogelijk omdat er een post-mortem analyse nodig is om de benodigde data te verkrijgen.*

**NTS**

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.

**D. Ethische afweging**

1. Benoem de centrale morele vraag (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A).

*Rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van de dieren?*

*Bij deze dierproef is de centrale morele vraag:*

*Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over de rol van mycobacteriële vetbolletjes in antibiotica tolerantie en daarmee de ontwikkeling van nieuwe effectievere medicijnen tegen tuberculose het gebruik van 6066 zebnavissen in de dierproef die daarvan maximaal ernstig ongerief ondervinden?*

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af.

*De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en een groot aantal dieren ondervindt ernstig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: veel voordeel vanwege de kennisontwikkeling. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Mogelijk veel voordeel op de langere termijn, wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen effectievere medicijnen tegen tuberculose.*

*De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en lange termijn belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 6066 zebnavissen die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Er sterven jaarlijks nog steeds meer dan een miljoen mensen aan de ziekte tuberculose, er zijn antibiotica beschikbaar, maar de behandeling duurt bijzonder lang en er is sprake van de ontwikkeling van antibiotica resistentie. Voor de ontwikkeling van een effectievere en kortere behandeling van tuberculose is onderzoek in diermodellen noodzakelijk. Er zijn op dit moment geen alternatieven voor deze dierproeven beschikbaar waarmee men de doelstellingen kan bereiken.*

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2).

*Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het doel van deze studie is kennis te verkrijgen over de rol van mycobacteriële vetbolletjes in antibiotica tolerantie. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van een adequate behandeling tegen tuberculose, is afgewogen tegen het, als maximaal ernstig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef.*

*De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 6066 zebnavissen en de daarmee samenhangende schade*

*aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.*

*(1) Het maatschappelijk en wetenschappelijk belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen informatie geven over de rol van mycobacteriële vetbolletjes en zullen bijdragen aan het beschikbaar komen van een effectievere behandeling van tuberculose.*

*(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken nauw samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.*

*Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren maatschappelijk en wetenschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 6066 zebrafissen en het daarbij verwachte maximaal ernstige ongerief.*

## **E. Advies**

### 1. Advies aan de CCD

*De DEC adviseert de vergunning te verlenen.*

### 2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

*Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.*

### 3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

*Het dilemma is dat een groot aantal dieren wordt gebruikt met ernstig ongerief bij experiment 2. Echter zijn zowel het wetenschappelijk als maatschappelijk belang erg groot, hierdoor wegen de belangen op tegen de kosten.*

*Als blijkt dat vetbolletjes daadwerkelijk een belangrijke rol spelen in de vorming van persisters en betrokken zijn bij antibiotica gevoeligheid, dan kunnen de onderzoekers dit proces gebruiken voor de ontwikkeling van nieuwe medicijnen tegen tuberculose. Er sterven jaarlijks nog steeds meer dan een miljoen mensen aan de ziekte tuberculose, er zijn antibiotica beschikbaar, maar de behandeling duurt bijzonder lang en er is sprake van de ontwikkeling van antibiotica resistentie. Een effectievere en kortere behandeling van tuberculose is dus zeer gewenst.*



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te  
Amsterdam

AMSTERDAM

**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  
AVD114002016803

**Bijlagen**

2

Datum 23 december 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 22 december 2016. Het gaat om uw project "The role of mycobacterial lipid bodies in antibiotic tolerance, towards better understanding of persistent Mycobacterium tuberculosis". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD114002016803. 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

**Datum:**

23 december 2016

**Aanvraagnummer:**

AVD114002016803

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**  
23 december 2016  
**Aanvraagnummer:**  
AVD114002016803

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11400  
Naam instelling of organisatie: Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 64156338  
Straat en huisnummer: de Boelelaan 1117  
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

**Datum:**  
23 december 2016  
**Aanvraagnummer:**  
AVD114002016803

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]  
Naam: [REDACTED]  
Adres: [REDACTED]  
Postcode en plaats: [REDACTED] AMSTERDAM  
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?  Nieuwe aanvraag  
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn  
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 januari 2018  
Geplande einddatum: 1 januari 2023  
Titel project: The role of mycobacterial lipid bodies in antibiotic tolerance, towards better understanding of persistent Mycobacterium tuberculosis  
Titel niet-technische samenvatting: De rol van mycobacteriele vetbolletjes in antibiotica tolerantie, voor een beter begrip van persistente Mycobacterium tuberculosis  
Naam DEC: DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum  
Postadres DEC: [REDACTED] Amsterdam | Nederland  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.187,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Amsterdam  
Datum: 22 december 2016

**Datum:**  
23 december 2016  
**Aanvraagnummer:**  
AVD114002016803



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

VU medisch centrum  
t.a.v. crediteuren administratie, [REDACTED]  
Postbus 7057  
1007 MB AMSTERDAM  
[REDACTED]

**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  
AVD114002016803  
**Bijlagen**  
2

Datum 23 december 2016  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 23 december 2016  
Vervaldatum: 22 januari 2017  
Factuurnummer: [REDACTED]  
Ordernummer: [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD114002016803	€ 1.187,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te  
Amsterdam

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED] AMSTERDAM  
[REDACTED]

**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  
AVD114002016803  
**Bijlagen**  
1

Datum 20 februari 2017  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 22 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The role of mycobacterial lipid bodies in antibiotic tolerance, towards better understanding of persistent Mycobacterium tuberculosis" met aanvraagnummer AVD114002016803. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

#### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "The role of mycobacterial lipid bodies in antibiotic tolerance, towards better understanding of persistent Mycobacterium tuberculosis" starten. De vergunning wordt afgegeven van 20 februari 2017 tot en met 1 januari 2023.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Beoordeling achteraf**

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

Een beoordeling achteraf is noodzakelijk in verband met ernstig ongerief.

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 22 december 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.

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

**Datum:**

20 februari 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD114002016803

**Bezwaar**

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

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

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

**Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

**Datum:**  
20 februari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD114002016803

ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

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





# Projectvergunning

## gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

**Naam:** Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam  
**Adres:** de Boelelaan 1117  
**Postcode en plaats:** 1081 HV AMSTERDAM  
**Deelnemersnummer:** 11400

deze projectvergunning voor het tijdvak 20 februari 2017 tot en met 1 januari 2023, voor het project "The role of mycobacterial lipid bodies in antibiotic tolerance, towards better understanding of persistent Mycobacterium tuberculosis" met aanvraagnummer AVD114002016803, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 22 december 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 22 december 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 22 december 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 22 december 2016, ontvangen op 22 december 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>M. marinum virulence screening in adult zebrafish</b>				
	Zebravissen (Danio rerio) / onbekend	3.024	61% Matig 39% Licht	
<b>Antibiotic susceptibility testing using the Cornell zebrafish model of tuberculosis</b>				
	Zebravissen (Danio rerio) /	3.042	95% Ernstig  5% Licht	

**Aanvraagnummer:**

AVD114002016803

**Voorwaarden**

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

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

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

In artikel 10, lid 1 sub a 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 afstemming met de IVD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



**Aanvraagnummer:**  
AVD114002016803

## Weergave wet- en regelgeving

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

**Aanvraagnummer:**  
AVD114002016803

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

#### **Einde van een dierproef**

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

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

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

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

#### **Beoordeling achteraf**

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.